



HAL
open science

Nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes d'entrée du virus de l'hépatite C

Lucie Fénéant

► **To cite this version:**

Lucie Fénéant. Nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes d'entrée du virus de l'hépatite C. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S008 . tel-01294899

HAL Id: tel-01294899

<https://theses.hal.science/tel-01294899>

Submitted on 30 Mar 2016

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 LILLE II

École Doctorale Biologie-Santé de Lille

Pour l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université de Lille II

**Nouveaux éléments dans la compréhension des
mécanismes d'entrée du Virus de l'Hépatite C**

Présentée et soutenue publiquement par :

Lucie FENEANT

Le 20 Mars 2015

Devant le jury composé de :

Pr. Didier HOBBER	Président
Dr. Mirjam ZEISEL	Rapporteur
Dr. Eric RUBINSTEIN	Rapporteur
Dr. François HELLE	Examineur
Pr. Réjane PAUMELLE	Examinatrice
Dr. Laurence COCQUEREL	Directrice de thèse

*A mon père
A ma mère et Markus
A Théofane*

« Rien ne peut jamais marcher si l'on songe
à tout ce qu'il faut pour que ça marche. »

Daniel Pennac (Monsieur Malaussène)

*« If you try and take a cat apart to see how
it works, the first thing you have on your
hands is a non-working cat. »*

Douglas Adams

« Alice laughed. "There's no use trying,"
she said: "one *can't* believe impossible things."
"I daresay you haven't had much practice,"
said the Queen. "When I was your age,
I always did it for half-an-hour a day.
Why, sometimes I've believed as many as
six impossible things before breakfast." »

Lewis Carroll (Through the Looking-Glass)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, Didier Hober, Mirjam Zeisel, Eric Rubinstein, Réjane Paumelle et François Helle pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je remercie également mes financeurs, l'Université Lille II ainsi que l'ANRS.

Je remercie ensuite tous les membres de mon labo pour ces plus de trois années passées avec vous.

Merci à Jean pour m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir logée à l'IBL pendant les 10 jours durant lesquels je me suis préparée au concours. En fait vous avez tous été formidables pendant cette période de stress intense vous avez su me donner l'envie de rester et j'avais vraiment hâte de commencer ma thèse dans ton labo. Profite Jean, c'est mon instant fayotte, ce n'est pas ma spécialité d'habitude ! (C'est parce que je suis fayotte de l'intérieur et que ça ne se voit pas à l'extérieur). J'en profite pour remercier sincèrement Jean-Luc Darlix pour m'avoir conseillé ton labo alors que je désespérais de trouver un laboratoire de thèse. Je ne savais pas où j'allais, je n'ai pas été déçue une seule seconde.

Merci à Laurence, ma directrice de thèse, pour m'avoir formée pendant ces quelques années à Lille. Merci pour ta confiance, ta patience et surtout... ton optimisme presque à toute épreuve ! Je te revois encore débarquer dans la salle du microscope avec les analyses statistiques de mes manips et me dire « Bon, maintenant, tu y crois ? ». Je pense que tu n'as pas compris que mon rêve ultime était de publier dans *The Journal of Negative Results*, alors que pourtant ma thèse était si bien partie pour !!! Tant pis, je ferais le deuil de ce rêve. Merci pour cette paire de chaussure que tu m'as offerte dans un moment de désespoir à mon retour des États-Unis (je sais que mon désamour pour les chaussures vous a tous un peu perturbés et je m'en excuse). Merci pour ton soutien dans les moments difficiles. Merci aussi d'avoir fait une place pour mes deux rates dans ton jardin, ça comptait beaucoup pour moi. Bref, je ne te remercierais jamais assez pour ces trois ans et demi de thèse qui ont été un enrichissement pour moi, aussi bien sur le plan humain que professionnel.

Merci à Czes, ma « vitamine D », qui certes n'irradie pas autant que mes bottes ukrainiennes, mais tout de même. Bien que je sois devenue, force est de le constater, votre « Benjamin Malaussène » du labo, je ne l'ai pas trop mal vécu (je pense que je le cherchais un peu aussi, je dois l'admettre) ! Merci pour le tiroir à -20°C que vous avez daigné me laisser au bout de longues semaines d'âpres négociations (et un avis d'expulsion), je pense en avoir fait bon usage.

Merci à André pour ton « soutien » indéfectible. Pour tes phrases à la fois toujours percutantes et poétiques à leur manière. Non, je n'ai pas oublié que j'étais « une ode en faveur de l'euthanasie ». (J'en profite pour lancer un SOS au monde entier (ou au moins à la communauté francophone (enfin... à ceux qui peut-être un jour liront cette thèse)), pour qu'on comprenne combien j'ai été maltraitée !)

Merci à Claire, pour ton soutien de chaque instant, pour tes explications toujours aussi claires que ton nom (l'auteur de ce mauvais jeu de mot n'a pas souhaité se dénoncer, merci de votre compréhension), pour ta patience. En parlant de mauvais jeu de mot, ça me rappelle la fine équipe Wint que nous formions à l'époque de Mélissa quand Laurence était en vacances. Le fameux trio « Soyez Palat et Fénéant » (il va sans dire que nous étions tout le contraire, si quelqu'un en doutait).

Merci à Sandrine, pour tous tes conseils, ton aide. Et aussi pour toujours penser à moi (la pénible qui ne peut pas faire comme tout le monde) pour que je puisse avoir quelque chose à manger, que ce soit au repas de Noël ou pour toute autre occasion. Ton expérience avec les cookies végétaliens à la compote de pomme était une véritable réussite !

Merci à Adeline, ne serait-ce que pour ce formidable duo de « je t'aime moi non plus » que vous formez avec Rayan. Depuis mon bureau, j'ai le droit à un spectacle perpétuel et gratuit tous les jours. Bon, tu es un peu une traîtresse parfois, mais dans un élan de magnanimité, je te pardonne.

Merci à Karin, pour ton aide, ta gentillesse. Merci encore pour les licornes que tu m'as offertes. Je remercie d'ailleurs Eulalie pour la licorne en mosaïque que j'ai hérité d'elle. Même si l'image que tes enfants ont de moi m'effraie un peu ! Parce que bon, quand tu achètes une licorne, qu'Adèle demande pour qui c'est et qu'Eulalie répond « c'est pour une collègue de maman », avouons-le, ça ne fait pas très future docteur tout ça.

Merci à Yves, pour tes conseils ainsi que pour tes talents de programmeur sous ImageJ qui ont épargnés mes yeux et mes neurones. Tes programmes m'ont été d'une aide plus que précieuse.

Merci à Soph, pour ton humour plus que douteux. Pour cette capacité à être aussi insupportable (mais c'est comme ça qu'on t'apprécie, c'est un peu ta marque de fabrique) que serviable.

Merci à Nathalie même si nous ne vivons pas sur la même planète, entre une adepte inconditionnelle du shopping et une fille qu'il faut traîner limite de force s'acheter des chaussures.

Merci à Muriel, pour ton aide et tes conseils. Merci d'avoir agrandi le club des gens de taille réduite dans le labo, je me sens moins seule.

Merci à Anne pour la touche d'exotisme que tu apportes dans le laboratoire avec tes crottes de chauve-souris.

Merci à Rayan (alias Chaton (non, pas taper, par pitié)), pour ce magnifique congrès à Lyon. Je revois encore ta tête quand on a ouvert la chambre d'hôtel et que tu as constaté avec un profond désarroi que les lits jumeaux étaient en fait siamois (C'est ça quand on me laisse carte blanche pour faire des économies). Merci pour chaque jour me faire ouvrir les yeux sur ma naïveté. Oui, je le confesse, ton histoire de trafic de poussins unijambistes m'a parue crédible.

Merci à Laura, nouveau membre du clan dissident des mange-moyens face à la dictature du clivage mange-tôt/mange-tard d'un autre âge ! Ma compagne de poisse, même si je crois que, malheureusement, tu as fini par me battre dans ce domaine... Bon, je reste quand même sceptique sur cette propension que tu as à ne pas être là quand je fais des réunions de labo, à partir en Turquie quand je présente en séminaire de département, voir même, ultime affront, partir à Londres le jour de ma thèse ! Je pense que n'importe quelle personne saine d'esprit y verrait là un complot. Maintenant quant à savoir si tu es plutôt Illuminatis ou reptiliens... je donne ma langue aux Francs-Maçons.

Merci à Marie-Emmanuelle, parce que j'aime bien faire des paris avec toi (je n'ai pas l'habitude de gagner des paris, c'est nouveau pour moi !). Je suis contente, après un an de persévérance, de te voir enfin te joindre à la pause goûter (qui reprend depuis peu ses titres de noblesses).

Merci à Amandine, ma relève ! Je compte sur toi pour terminer le projet CD151 (je n'essaye pas de te mettre la pression hein, tu sais que ce n'est pas mon genre !). Je te souhaite bien du courage, parce qu'être ma relève, c'est l'être avec tous les accessoires, ce qui signifie donc d'être la victime de Czes et André entre autres.

Merci à Arianne, ma fournisseuse officielle de sachets de thé et de carrés de chocolat. Bien que je devrais me méfier en fait, j'ai peur que tu y glisses sournoisement un jour du KCl.

Merci aux nouveaux, que je n'ai pas encore eu le temps de connaître vraiment (fallait pas arriver en plein pendant la rédaction de ma thèse aussi !). Je pense à Cécile-Marie, Boris, Juliano et Vivien.

Merci à Angy, le fantôme du we qui hante les couloirs de l'IBL. Pour toutes ces discussions parfois sans queue ni tête, que nous avons eues.

Merci à tous les autres dont j'ai pu croiser la route au cours de ma thèse. Mais comme j'ai peur d'en oublier dans la liste, je préfère ne vexer personne et me résigner à ne pas faire de liste.

Merci maintenant aux anciens du labo. Qui sont lâchement partis.

Merci tout d'abord à Thibaut, pour cet ami formidable que tu es devenu pour moi. Pour nos fou rires et tous les AVC que j'ai déclenché chez toi avec mes histoires de licornes et de Toupoutous. Pour nos discussions interminables le soir au téléphone à refaire le monde alors que nous nous étions déjà supportés toute la journée. Pour nos « soirées gras » avachis dans ton canapé à nous préparer à la fin du monde qui n'a pas eu lieu (Faut dire que la comète Elenine qui annonçait l'arrivée de Nibiru, planète supposée percuter la terre, s'est quand même faite pulvériser par une éruption solaire. Un signe qui ne trompe pas). Pour avoir approfondi avec moi certaines questions scientifiques cruciales telle que « Et si les extra-terrestres de Roswell étaient venus envahir la Terre à cause d'un signal perçu comme une menace depuis notre planète ? ». (Pour information pour le lecteur curieux, en supposant qu'ils voyageaient à la vitesse de la lumière et

qu'ils venaient du système solaire le plus proche du notre, l'arrivée du tramway à Moscou aurait semble-t-il été perçu comme un signal d'invasion).

Merci à Nana, parce que nous avons perdu une fidèle mange-moyens. En tout cas, c'était une vraie bouffée d'air frais de manger avec toi et les autres quand je me levais à midi après une nuit d'écriture pendant la rédaction de ma thèse.

Merci à Julie, pour les bons moments passés avec toi. Pour la confiance que tu m'as accordé pour terminer ton projet.

Merci à Xavier, pour nos instants de folie à imiter les vélociraptors en faisant le cri du schtroumpff noir.

Merci à Juliette, même si tu n'es plus vraiment une ancienne, vu que tu vas revenir ! Je suis quand même déçue que tu ne reviennes que quand je quitterai le labo. C'est beaucoup trop injuste (comme le disait le célèbre philosophe Calimero).

Merci à Emeric, pour m'avoir aidée à percer les mystères de la cytométrie. Pour nos longues discussions sur tout et rien dans ce bâtiment, à l'époque encore presque désert, qu'était le CEREAAT.

Merci à Yan, Sohail, Ahmed, Pyd, pour les bons moments passés avec vous, bien que la rencontre fut de courte durée pour certains.

Merci à mes deux formidables stagiaires. Je pense à Alice, qui a compris qu'amener des chocolats à ses maîtres de stage permettait de réussir dans la vie. Je pense aussi à Marion, pour l'intérêt que tu as porté à ton sujet de stage, pour ton dévouement pour la science, parfois jusqu'à des heures indues.

Je remercie aussi l'appariteur (que j'ai du traumatiser), qui était là le jour où j'ai débarqué à minuit déguisée en vampire après le carnaval de Dunkerque et qui m'a demandé ce que je venais faire... et à qui j'ai répondu, étonnée de sa question « ben je viens travailler » (comme si ça ne se voyait pas).

Je tiens maintenant à remercier mes proches, parce que sans vous, ça n'aurait quand même pas été pareil ! Vous êtes mon oxygène !

Merci à Sacral, ma meilleure et plus « vieille » amie. Plus de 20 ans que l'on se connaît maintenant. On a accumulé tellement de souvenirs (et de films d'horreurs) ensembles... On ne se voit pas très souvent, mais ça ne change rien à l'amitié qui nous unit. Merci d'être là.

Merci à Lucie et Elodie. Il est loin le temps où l'on partageait un appartement en terminale. Et pourtant... vous voir à nouveau réconciliées pour ma thèse, c'est un des plus beaux cadeaux que l'on pouvait me faire. Merci de vous être démenées pour organiser le voyage de la troupe Aveyronnaise et Gardoise et d'avoir géré mon pot de thèse. Vous êtes toujours aussi bien organisées qu'à l'époque de l'appart', je vous promets, je m'occupe des poubelles à la fin du pot (on ne perd pas les bonnes habitudes). J'en profite pour remercier Régine, pour m'avoir si souvent accueillie et

Jean-Louis ainsi que Sébastien. Je remercie aussi William en te souhaitant un bon rétablissement. Mais également le nouveau venu, Victor.

Merci à Julien et Laeti, pour votre amitié de longue date. Pour les bons moments passés avec vous aux quatre coins de la France. Pour votre courage (vous êtes des modèles). J'attends votre mariage avec impatience !

Merci à Margot, il y aurait tant à dire. Merci d'avoir été là dans les moments les plus difficiles. De m'avoir mis des « coups de pied aux fesses » quand j'en avais besoin. Merci pour tous nos délires, des draps Bonne Maman à Morphée en passant par Black Sheep et la photocopieuse d'Angel et Manuela. Merci pour tous tes conseils de cinéphile avisée (parce que contrairement au film et à la série précédemment évoqués, non, tu ne regardes pas que des nanards), qu'un jour je suivrai (après ma thèse, ou après mon post-doc, ou après...).

Merci à Nico pour nos moult escapades de Roubaix à Tchernobyl en passant par Charleroi et Ostrava. Des bouffées d'air « frais » (mon petit doigt me dit que le terme n'est pas vraiment adapté) pour souffler un peu pendant ma thèse. Et merci à Lucia d'avoir courageusement subit certaines d'entre elles.

Merci à David, pour tous tes précieux conseils (que je ne suis jamais). Pour ton inconscience en randonnées (moi j'ai peut-être peur d'être mangée par des cannibales dans les Carpates certes, mais se faire manger par un ours à Brasov en revanche, ce n'est plus du domaine de la science fiction).

Merci à Adèle et Maud pour tout. Mais genre vraiment tout. Vous êtes mes Blanche-Neige à moi (oui vous avez réussi cet exploit de me réconcilier avec Blanche-Neige !). Je ne sais pas comment j'aurais pu survivre sans vous en fait, vus tous les services que vous m'avez rendus depuis que je suis à Lille. Vous avez toujours la petite attention qui fait plaisir. Merci pour votre hospitalité dans les moments difficiles aussi. Vous êtes des filles en or, que dis-je, en diamant (la subtilité parlera sans doute à Maud).

Merci à Claire, pour tous ces moments passés avec toi sur Lille même si tu m'as lâchement lâchée pour émigrer dans les Alpes (alors que franchement, on a les terrils pas loin... quoi, c'est tout aussi bien ! Non ?).

Merci à Morgane, mon Morpion. Parce que ça fait trop longtemps que je ne t'aie pas vue et qu'il est grand temps que nous comparions nos hippie-attitudes respectives !

Merci à AD, même si t'es partie loin, à Manhattan (dans le Kansas, pour casser un peu le mythe) et que du coup ça fait une éternité que je ne t'aie pas vue.

Merci à Amélie, toi aussi, t'as migré trop loin, mais bon, tu es et tu resteras mon meilleur binôme de tous les temps. Tu es une amie formidable et j'espère te revoir en chaire et en os, ici ou ailleurs, le plus vite possible.

Merci à Alex, pour nos escapades, pour tes histoires souvent abracadabrantesques aux quatre coins du monde (je ne sais jamais, en t'écoutant, si c'est un extrait du Monde Diplomatique ou des mille et une nuits, c'est dire).

Merci à Laurence et Gaëlle, mes strasbourgeoises préférées.

Merci à Maud, même si je ne te vois que trop rarement et que je n'ai toujours pas goûté tes créations culinaires !

Merci à Susan, Mike et Holly, pour, 9 ans après, m'avoir à nouveau accueillie chez vous l'été dernier. Une pause nécessaire avant la dernière ligne droite qui m'a véritablement ressourcée. Vous n'avez pas changés, vous êtes toujours aussi formidables et généreux. J'ai hâte de vous voir en France.

Merci à Wint et Trypsine, pour m'avoir accompagnée pendant une bonne partie de ma thèse. Malgré mon lit IKEA (non, ceci n'est pas un placement de produit), déchiqueté, ma tapisserie en lambeaux, mes vêtements et mes draps troués, mes livres rongés, les articles que vous avez planqués pour vous en faire un nid (oui, je me doute que si vous m'avez volé cet article de Jane McKeating, ce n'était pas pour en faire la review), vous avez été des rates formidables et vous me manquez terriblement.

Enfin, je remercie ma famille, de sang pour certains (en comité restreint), et de cœur. Parce que sans vous, je n'en serais jamais arrivée là.

Merci à toute la famille Coudière : Véronique, Michel, Lydie, Valérie, Marie-Astrid, Thomas, Benjamin, Pilou et Françoise, pour être toujours là, et ce depuis tant d'années. Merci en particulier pour ce dernier Noël, qui fut une véritable réussite.

Merci à Huguette et Pierrot, pour m'accueillir régulièrement quand j'ai besoin de changer d'air (enfin, quand j'arrive à vous joindre au téléphone sans passer par les renseignements généraux). Et merci aussi à Mamie, même si tu n'es plus là, s'il y a bien une chose dont j'ai héritée de toi, c'est de ton débit de parole !

Merci à Théofane, mon Boudin (pardon, mais c'est plus fort que moi, c'est sorti tout seul). Aurais-je pu seulement rêver d'une meilleure petite sœur (au sens propre et figuré) que toi ? J'ai vraiment de la chance de t'avoir tu sais, même si je ne te vois pas assez souvent à mon goût (mais c'est plus de ma faute que de la tienne). Merci d'être venue si souvent depuis que je suis à Lille, que ce soit pour le Nouvel An, visiter la Belgique ou bien ramasser des ponceuses électriques maléfiques. Merci d'avoir les pieds sur Terre quand parfois avec Maman, on frôle l'orbite de Neptune (on a besoin de toi pour nous canaliser). Merci pour ta générosité, pour toutes tes petites attentions. Bref, merci d'être toi. Je t'aime Boudin. J'en profite pour remercier ton Thibaut à toi, parce qu'il a quand même eu le courage de venir avec toi jusque chez moi, loin de sa Lozère natale.

Merci à toi Papa. Parce que je sais que si tu étais encore là, tu serais fier de moi. Merci de m'avoir fait aimer les sciences alors que j'étais encore toute petite (oui, parce que m'avoir mis un Science & Vie, même pas junior, qui expliquait le fonctionnement des prions alors que je n'avais que 8 ans... ça aurait pu me traumatiser à vie. Mais non, je l'ai sagement lu à l'époque). Je pense avoir rempli ma « part du contrat », je t'avais promis de « toujours bien travailler à l'école », je pense que c'est chose faite. Merci de m'avoir

donné l'élan nécessaire pour en être arrivée où j'en suis, même si j'aurais tellement aimé partager ce moment avec toi.

Merci à toi Maman pour tout. Pour m'avoir toujours soutenue dans chacun de mes projets, de mes choix. Pour m'avoir laissée voler de mes propres ailes (même si je t'appelle encore quand mes plaques électriques tombent en panne et qu'à 700 km il est évident que tu ne peux rien faire (mais c'est une question de principe)), bref, de m'avoir toujours fait confiance. Pour nos discussions téléphoniques parfois surréalistes (il faut dire que l'Aveyron, et plus particulièrement Sévérac-le-Château, sont dans une dimension éminemment parallèle au monde dit normal), presque quotidiennes qui me font oublier que je ne te vois que trop rarement. Merci de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de la littérature (parce que oui, je le confesse, il m'arrive de lire autre chose que des articles scientifiques). J'aurais mille et une choses à te dire, mais les mots me manquent, bien que cela pourrait se résumer en trois mots : je t'aime. Et je remercie Markus. J'hésite toujours à savoir qui est le plus patient pour supporter l'autre, ce qui me fait dire que vous vous êtes bien trouvés, ce qui est à marquer d'une pierre blanche (à condition de trouver le compresseur adéquat, les initiés comprendront).

Table des matières

Liste des Figures	21
Liste des tableaux.....	21
Liste des abbréviations.....	23
Résumé.....	29
Abstract.....	31
Introduction	33
I- L'HEPATITE C.....	35
A- Epidémiologie.....	35
1- Prévalence.....	35
2- Voies de transmission.....	36
B- Evolution de la maladie.....	37
1- Hépatite C aiguë.....	38
2- Hépatite C chronique.....	39
C- Diagnostic.....	40
II- LE VIRUS DE L'HEPATITE C (HCV)	43
A- Découverte.....	43
B- Classification.....	43
C- La particule virale	45
1- Structure et propriétés de la particule virale	45
2- Organisation de l'ARN génomique viral.....	47
a- Généralités.....	47
b- Les régions non-codantes.....	48
i) La région 5'-UTR.....	48
ii) La région 3'-UTR.....	49
c - Les protéines structurales	50
i) La protéine core	50
ii) Les glycoprotéines E1 et E2.....	51
d- Les protéines non-structurales.....	56
i) La protéine p7.....	56
ii) La protéine NS2	57
iii) Le complexe NS3/4A.....	57
iv) La protéine NS4B	59
v) La protéine NS5A.....	60
vi) La protéine NS5B	61
vii) La protéine F.....	63
D- Modèles d'étude	64
1- Débuts.....	64
2- HCVpp.....	66
3- HCVcc	68
4- Cellules permissives	70
5- Modèles animaux	71
a- Chimpanzés.....	71
b- Toupayes.....	72
c- Rongeurs.....	72
i) Souris transgéniques exprimant des protéines virales	72
ii) Souris et rats xénotransplantés	73
iii) Souris génétiquement humanisées.....	75
III- LE CYCLE DE REPLICATON DU HCV.....	77
A- Entrée.....	78
1- Les facteurs d'attachement.....	80

a- Les lectines	80
b- Les GAGs.....	81
c- LDL-R	82
2- Les facteurs d'entrée spécifiques.....	83
a- CD81.....	83
b- SR-BI	83
c- Protéines de jonctions serrées.....	86
i) Les jonctions serrées	86
ii) Claudine-1, -6 et -9	87
iii) Occludine.....	90
d- Récepteurs tyrosine kinase.....	92
e- Les nouveaux facteurs d'entrée.....	94
3- Endocytose.....	96
4- Fusion.....	97
5- Transmission cellule-cellule.....	98
B- Traduction et réplication.....	100
1- Traduction et synthèse des protéines virales.....	100
2- Réplication de l'ARN viral.....	101
C- Assemblage et sécrétion.....	102
IV- LA REPONSE IMMUNITAIRE AU HCV	107
A- Réponse immunitaire innée	107
1- Réponse interférons	107
a- Détection du HCV et induction de la réponse IFNs.....	107
b- Echappement du HCV à la réponse IFNs.....	110
2- Cellules NK.....	110
a- Généralités.....	110
b- Cellules NK et phase précoce de l'infection par le HCV	111
c- Cellules NK et infection chronique par le HCV	111
3- Cellules dendritiques.....	112
a- Généralités.....	112
b- Induction et inhibition de l'activité des DCs par le HCV.....	113
B- Immunité adaptative	113
1- Réponse humorale.....	113
2- Réponse médiée par les lymphocytes T.....	114
a- Généralités.....	114
b- Lymphocytes T et HCV	115
3- Echappement à la réponse immunitaire adaptative.....	115
V- LES TRAITEMENTS CONTRE LE HCV	119
A- La bithérapie IFN/Ribavirine	119
B- Les molécules ciblant directement le virus	120
1- Les inhibiteurs de protéase	120
2- Les inhibiteurs de la polymérase virale	121
3- Les inhibiteurs de NS5A	121
4- Autres cibles virales potentielles	122
C- Les molécules ciblant la cellule hôte.....	123
D- Recherche d'un vaccin	124
VI- RESISTANCE NATURELLE AU HCV ET FACTEURS DE PREDICTION DE L'EVOLUTION DE LA MALADIE.....	127
A- Facteurs de risques	127
B- Système immunitaire	128
1- IL28B et IFNL4	128
a- Les IFN- λ s.....	128
b- Rôle antiviral des IFN- λ s.....	129
c- Les polymorphismes de l' <i>IL28B</i> et de l' <i>IFNL4</i>	130
i) Polymorphisme de l' <i>IFNL4</i>	130
ii) Polymorphisme de l' <i>IL28B</i>	132
iii) Mécanismes moléculaires	132
d- Autres polymorphismes dans les gènes de la réponse IFNs	133

2- Cellules NK.....	133
a- Expression de NKp30	133
b- Récepteurs KIRs et système HLA	134
3- Réponse aux lymphocytes T.....	138
a- Production d'IFN- γ	138
b- Système HLA	139
c- Polymorphismes des cytokines produites par les lymphocytes T	140
C- Facteurs cellulaires.....	140
1- Polymorphisme de la cyclophiline A	140
2- Polymorphisme de CD81	140
3- Polymorphisme de CLDN-1, OCLN et LDL-R.....	141
D- Autres facteurs.....	142
VII- LES TETRASPANINES.....	143
A- La superfamille des tétraspanines.....	143
1- Généralités	143
2- Structure des tétraspanines	144
a- Les boucles extracellulaires.....	145
b- Les domaines transmembranaires	146
c- Les domaines intracellulaires	146
3- Expression et localisation des tétraspanines.....	147
B- Organisation membranaire des tétraspanines.....	148
1- Protéines partenaires.....	148
2- Tetraspanin web ou TEMs	150
3- Dynamique membranaire des tétraspanines et TEAs.....	151
C- Rôles physiologiques des tétraspanines	153
D- Tétraspanines et infections virales	155
1- Tétraspanines et Retroviridae.....	155
2- Tétraspanines et papillomavirus	157
3- Tétraspanines et autres virus.....	158
VIII- LES IONOPHORES ET LEUR ACTIVITE ANTIVIRALE	161
A- Généralités	161
1- Définition	161
2- Classification	161
3- Affinité	162
4- Rôles biologiques et applications.....	163
a- Rôles physiologiques	163
b- Applications.....	163
i) Etudes des transferts membranaires	163
ii) Rôle antibactérien.....	164
iii) Rôle antiparasitaire	165
iv) Rôle antiviral.....	166
v) Rôle antifongique	167
vi) Rôle anticancéreux.....	167
5- Les ionophores polyéthères.....	168
B- La Monensine A.....	169
1- Monensine et infections	170
a- Parasitaires	170
i) Effet anti-coccidial	170
ii) Effet antipaludique.....	172
b- Bactériennes.....	173
c- Virales.....	174
i) Inhibition de l'entrée virale	174
ii) Inhibition de l'assemblage et de la sécrétion des particules virales.....	174
2- La Monensine dans l'industrie agro-alimentaire	175
a- Traitement des coccidioses.....	176
b- Promoteur de croissance	176
c- Autres utilisations	177
C- Les dérivés de Monensine	179

Contexte et objectifs des travaux	183
Partie 1 :	185
Identification et analyse fonctionnelle de variants de facteurs d'entrée du Virus de l'Hépatite C (HCV) retrouvés chez des patients très exposés mais non infectés par le HCV.....	185
Partie 2 :	189
CD151, un organisateur moléculaire potentiel de l'entrée du HCV.....	189
Partie 3 :	195
Nouveaux éléments dans la compréhension de l'entrée et de la transmission cellule-cellule du Virus de l'Hépatite C grâce à l'utilisation de la Monensine A.....	195
Resultats	199
Partie 1:	201
Identification and functional analysis of variants of Hepatitis C Virus (HCV) entry factors found in patients highly exposed but not infected with HCV.....	201
Partie 2 :	237
CD151, un organisateur moléculaire potentiel de l'entrée du HCV.....	237
Partie 3 :	253
New insights into the understanding of hepatitis C virus entry and cell-to-cell transmission by using ionophore Monensin A.....	253
Discussion	313
Partie 1 :	315
Identification et analyse fonctionnelle de variants de facteurs d'entrée du Virus de l'Hépatite C (HCV) retrouvés chez des patients très exposés mains non infectés par le HCV.....	315
1- Identification de variants de CLDN-6, OCLN et SR-BI retrouvés chez des patients UDIV HIV+/HCV-.....	315
2- Les variants R209Q et P24A exprimés seuls n'affectent pas l'entrée du HCV.....	316
3- Les variants R209Q et P24A co-exprimés dans un système hétérozygote n'affectent pas l'entrée du HCV.....	317
4- Les variants R209Q et P24A n'affectent pas l'infection par le HCV dans des cellules polarisées.....	318
5- Les variants R209Q et P24A n'exercent pas une restriction sur l'entrée du HCV de manière dépendante du génotype.....	320
Partie 2 :	323
Rôle de la tétraspanine CD151 dans le cycle infectieux du HCV	323
1- CD151 est impliquée dans l'infection par le HCV.....	323
2- CD151 n'interagit pas directement avec les particules virales.....	325
3- CD151 empêche la clusterisation de CD81	326
4- Perspectives.....	327
Partie 3 :	329
Nouveaux éléments dans la compréhension de l'entrée et de la transmission cellule-cellule du Virus de l'Hépatite C grâce à l'utilisation de la Monensine A.....	329
1- La Monensine inhibe une étape tardive de l'entrée du HCV.....	329
2- La Monensine inhibe l'étape de fusion du HCV.....	331
3- La Monensine inhibe la transmission cellule-cellule.....	332
4- Une population et un clone viral sont moins dépendants du pH et utilisent une voie d'entrée différente de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine.....	332
5- Les mutations I399T et Y297H entraînent des changements conformationnels dans les glycoprotéines d'enveloppe.....	333
6- Les mutations I399T et Y297H entraînent la formation de particules virales moins associées aux lipoprotéines	335
Bibliographie	339

Liste des Figures

<i>Figure 1 : Prévalence de l'hépatite C dans le monde.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 2 : Evolution de l'infection par l'hépatite C.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 3 : Arbre phylogénétique des Flaviviridae.....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 4 : Distribution géographique des géotypes du HCV.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 5 : Organisation de la lipovirionne du HCV.....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 6 : Organisation génomique du HCV et maturation de la polyprotéine virale.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 7 : Représentation schématique de l'IRES du HCV.....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 8 : Représentation des glycoprotéines E1 et E2.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 9 : Structure cristallographique de E2.....</i>	<i>55</i>
<i>Figure 10 : Structure de la polymérase virale NS5B.....</i>	<i>62</i>
<i>Figure 11 : Organisation des réplicons subgénomiques.....</i>	<i>65</i>
<i>Figure 12 : Production des HCVpp.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 13 : Production des HCVcc.....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 14 : Génération de souris humanisées par xénogreffes.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 15 : Cycle de réplication du HCV.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 16 : Entrée du HCV.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 17 : Représentation schématique de SR-BI.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 18 : Polarisation des hépatocytes.....</i>	<i>87</i>
<i>Figure 19 : Représentation schématique de CLDN-1, -6 et -9.....</i>	<i>88</i>
<i>Figure 20 : Représentation schématique de OCLN.....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 21 : Réplication et assemblage du HCV.....</i>	<i>105</i>
<i>Figure 22 : Détection du HCV et induction de la réponse IFNs.....</i>	<i>108</i>
<i>Figure 23 : Voies de signalisation des IFNs.....</i>	<i>109</i>
<i>Figure 24 : Résumé de la réponse immunitaire innée et adaptative à l'infection par le HCV.....</i>	<i>117</i>
<i>Figure 25 : Polymorphisme de l'IFNL4.....</i>	<i>131</i>
<i>Figure 26 : Haplotypes des récepteurs KIRs.....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 27 : Organisation moléculaire des récepteurs KIRs.....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 28 : Carte génétique des antigènes de leucocytes humains (HLA).....</i>	<i>137</i>
<i>Figure 29 : Arbre phylogénétique des tétraspanines.....</i>	<i>144</i>
<i>Figure 30 : Organisation structurale des tétraspanines.....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 31 : Vue dynamique du tetraspanin web.....</i>	<i>153</i>
<i>Figure 32 : Mécanismes de transport des ions par les ionophores mobiles.....</i>	<i>162</i>
<i>Figure 33 : Structure de la Monensine complexée à un ion monovalent.....</i>	<i>169</i>
<i>Figure 34 : Cycle de réplication des Eimeria et action de la Monensine.....</i>	<i>171</i>
<i>Figure 35 : Cycle de réplication du Plasmodium et action de la Monensine.....</i>	<i>173</i>
<i>Figure 36 : Production des corps cétoniques chez la vache laitière et action de la Monensine.....</i>	<i>178</i>
<i>Figure 37 : Représentation de la dynamique membranaire de CD81 modulée par EWI-2wint.....</i>	<i>190</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Stratégies de traitement actuelles et à venir.....</i>	<i>122</i>
<i>Tableau 2 : Exemples de protéines partenaires de tétraspanines.....</i>	<i>149</i>
<i>Tableau 3 : Propriétés antimicrobiennes et anticancéreuses des ionophores polyéthers.....</i>	<i>181</i>
<i>Tableau 4 : Propriétés antimicrobiennes et anticancéreuses des ionophores neutres et des quasi-ionophores.....</i>	<i>182</i>

Liste des abréviations

A

AH	Helice Amphipatique
ALAT	ALanine Amino Transférase
Apo	Apolipoprotéine
ARFP	<i>Alternative Reading Frame Protein</i>
ASAT	Aspartate Amino Transférase
ATP	Adénosine Tri-Phosphate

C

CCL	<i>C-C Chemokine</i>
CCR	<i>C-C Chemokine Receptor</i>
CDV	Virus de la maladie de Carré
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
CIDEB	<i>Cell death-inducing DFFA-like effector b,</i>
CK	Caséine Kinase
CLDN	Claudine
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CypA	Cyclophiline A

D

DAA	<i>Direct acting Antiviral Agent</i>
DC	Cellules Dendritiques
DC-SIGN	<i>DC-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non integrin</i>
DGAT1	DiacylGlycerol O-AcylTransferase 1

E

ECL	Boucle extracellulaire
ECMV	Virus de l'encéphalomyocardite
EGF-R	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EphA2	Ephrine A2

F

FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
------	---

G

GAG	Glycosaminoglycane
GAF	<i>Gamma-IFN Activation Factor</i>
GAS	<i>Gamma-IFN Activated Sequence</i>
GL	Gouttelette Lipidique
GTP	Guanosine TriPhosphate

H

HAV	Virus de l'Hépatite A
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF-like</i>
HBV	Virus de l'Hépatite B
HCV	Virus de l'Hépatite C
HCVcc	Particules de HCV produites en culture cellulaire
HCVpp	Particules de HCV pseudotypées
HCVtcp	Particules de HCV transcomplémentées
HDL	Lipoprotéine de faible densité
HEV	Virus de l'Hépatite E
HIV	Virus de l'Immunodéficience Humaine
HLA	Human Leukocyte Antigens
HpgV	<i>Human Pegivirus</i>
HPAI	<i>Highly Pathogenic Avian Influenza virus</i>
HPV	<i>Papillomavirus</i> Humain
HSV	Virus de l'Herpès Simplex
HTLV	Virus T-Lymphotropique Humain
hVAPA	<i>Human Vesicle-Associated Protein</i>
HVR-1, -2	<i>HyperVariable Region 1, 2</i>

I

IAV	Virus de l'Influenza A
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IgVR	<i>Intergenotypic Variable Region</i>
IL	InterLeukine
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
ISG	<i>Interferon Stimulated Gene</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibiting Motif</i>

J

Jak	<i>Janus kinase</i>
JFH1	<i>Japanese Fulminant Hepatitis 1</i>

K

KIR *Killer cells Ig-like Receptor*
KO *Knock-Out*

L

LDL *Lipoprotéines de faible densité*
LDL-R *Récepteur aux LDLs*
LEL *Large boucle extracellulaire*
LTR *Long Terminal Repeat*

M

MAPK *Mitogen Activated Protein Kinase*
mDC *Cellules Dendritiques myéloïdes*
miR *microARN*
MLV *Virus de la leucémie murine*
MTP *Microsomal triglyceride-Transfer Protein*
MyD88 *Myeloid Differentiation primary response gene*

N

NCR *Natural Cytotoxicity Receptor*
NF- κ B *Nuclear Factor-kappa B*
NK *Natural Killer*
NLR *Nod-Like Receptor*
NPC1L1 *Niemann-Pick C1-like 1*
NPHV *Non Primate HepaciVirus*

O

OAS *2',5'-oligo adénylate synthétase A*
OCLN *Occludine*
ORF *Open Reading Frame*

P

PAMP *Pathogen Associated Molecular Pattern*
PCR *Polymerase Chain Reaction*
pDC *Cellules Dendritiques plasmacytoïdes*
PHH *Hépatocyte Primaire Humain*
PI3K *phosphoinositide 3-kinase*
PKR *Protéine Kinase R*
PRR *Pathogen Recognition Receptor*
PRRSV *Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc*

PsV Pseudovirion

R

RdRp ARN polymérase ARN dépendante
RE Reticulum Endoplasmique
RHV *Rodent HepaciVirus*
RIG-I *Retinoic acid-Inducible Gene 1*
RT-PCR *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

S

SARS Syndrome respiratoire aigu sévère
SCID *Severe Combined ImmunoDeficiency*
SEL Petite boucle extracellulaire
SFV Virus de la Forêt de Semliki
SMT *Single Molecule Tracking*
SOCS *Suppressor Of Cytokine Signaling*
SP *Signal Peptidase*
SpgV *Simian PegiVirDs*
SPP *Signal Peptide Peptidase*
SR-BI Récepteur Scavenger de Classe B de type 1
STAT *Signal Transducer and Activator of Transcription*,
SVR Réponse Virologique Soutenue

T

TBEV Virus de la méningo-encéphalite à tiques
TEA *Tetraspanin Enriched Area*
TEM *Tetraspanin Enriched Microdomain*
TfR Réceteur à la transferrine
TIRF *Total Internal Reflection Fluorescence*
TJ Jonction serrée
TLR *Toll-Like Receptor*
TMA *Transcription-Mediated Amplification*
TMD Domaine Transmembranaire
TNF- α *Tumor Necrosis Factor alpha*
TRAIL Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRIF TIR-domain-containing adapter inducing InterFeron-beta
Tyk Tyrosine kinase

U

UpA UroPlakine
UTR UnTranslated Region

V

VLDL	Lipoprotéine de très faible densité
VLP	<i>Virus-Like Particle</i>
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculaire

Z

ZO	<i>Zona Occludens</i>
----	-----------------------

Résumé

Le Virus de l'Hépatite C (HCV) est un problème majeur de santé publique qui touche plus de 170 millions de personnes dans le monde. Le HCV cible essentiellement les hépatocytes où il effectue son cycle de réplication qui peut-être divisé en trois étapes majeures : l'entrée de la particule virale qui aboutit à la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme, la traduction/réplication du génome viral et l'assemblage/sécrétion des particules néosynthétisées. Durant ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'étape d'entrée qui est un processus complexe multiséquentiel faisant intervenir de nombreux facteurs cellulaires. Le virus se lie d'abord à la surface cellulaire via des facteurs d'attachement puis interagit avec des facteurs d'entrée spécifiques tels que la tétraspanine CD81, le récepteur scavenger B1 et les protéines de jonctions serrées CLDN-1, -6, -9 et OCLN. La particule virale est ensuite internalisée via une endocytose dépendante de la clathrine, puis sous l'action du pH acide des endosomes les enveloppes virale et cellulaire fusionnent permettant la libération de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule infectée.

Parmi les facteurs cellulaires impliqués dans l'entrée du HCV, deux protéines de la famille des tétraspanines ont été identifiées, CD81 et CD63. Les tétraspanines sont des protéines transmembranaires capables de former des microdomaines enrichis en tétraspanines en interagissant entre elles ainsi qu'avec des protéines dites partenaires. Nous avons testé l'implication dans l'entrée virale des tétraspanines exprimées dans les hépatocytes. Ainsi, nous avons montré que CD151 semble également important pour l'entrée du HCV. CD151 aurait un rôle indirect sur l'entrée en jouant sur l'organisation membranaire, en empêchant CD81 de former des clusters qui restreignent l'entrée du virus.

Nous avons aussi étudié le rôle que pouvait jouer les polymorphismes de facteurs d'entrée sur l'entrée virale. Sur une cohorte de patients toxicomanes infectés par le HIV mais non infectés par le HCV, deux mutations ont été identifiées, R209Q dans CLDN-6 et P24A dans OCLN, qui n'étaient pas présentes dans les populations contrôles ou coinfectées par le HCV. Chez les patients toxicomanes, il est très rare que les patients infectés par le HIV ne le soient pas par le HCV, suggérant une résistance naturelle de ces patients à l'infection. Nous avons émis l'hypothèse que ces deux mutations pouvaient bloquer l'entrée du HCV. Cependant, la caractérisation de ces mutations a montré qu'elles n'avaient pas d'effet fonctionnel *in vitro*.

Enfin, nous avons exploré l'effet de la Monensine, un ionophore polyéther, sur l'infection par le HCV. Cette molécule augmente le pH des endosomes via ses capacités de transfert d'ions à travers les membranes cellulaires. Nous avons montré qu'elle inhibe l'entrée du HCV en bloquant la fusion. De manière intéressante, la transmission cellule-cellule, un mécanisme d'entrée du virus encore mal caractérisé, était également bloquée par la Monensine, suggérant une étape de fusion dépendante du pH pour cette voie. Nous avons généré des mutants de résistance à la Monensine, notamment le clone FL-8 qui portait deux mutations dans les glycoprotéines d'enveloppe, Y297H dans E1 et I399T dans E2. Les particules virales portant ces deux mutations infectaient les cellules de manière indépendante du pH, présentaient des propriétés physicochimiques différentes et ne se transmettaient plus de cellule à cellule.

En conclusion ces études soulignent l'importance de l'organisation membranaire pour l'entrée du virus via certains facteurs cellulaires tels que CD151. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que la transmission cellule-cellule était dépendante du pH et que des mutations ponctuelles dans E1 et E2 permettent une fusion indépendante du pH. En revanche, des polymorphismes naturels de CLDN-6 et OCLN n'affectent pas leur capacité à supporter l'entrée virale.

Abstract

Hepatitis C Virus (HCV) is a global health problem with over 170 million infected people worldwide. HCV targets mainly the hepatocytes and its lifecycle is divided into three steps. Viral particle entry leads to the release of viral genomic RNA into the cytoplasm where translation and replication take place. Then, new viral particles are assembled and secreted. During my thesis, we focused on the entry step. Indeed, HCV entry is a complex multistep process that requires numerous cellular factors. First, the virus interacts with attachment factors and then interacts with specific cellular factors including the tetraspanin CD81, the scavenger receptor B1 and the tight junction proteins CLDN-1, -6, -9 and OCLN. The viral particle is next internalized through a clathrin-dependent endocytosis. Finally, fusion at low pH occurs between viral and endosomal membranes leading to the release of the capsid into the cytoplasm.

Among cellular factors involved in HCV entry, two members of the tetraspanin superfamily were identified, CD81 and CD63. Tetraspanins are transmembrane proteins able to organize themselves in tetraspanin-enriched microdomains through tetraspanin-tetraspanin interactions and interactions with partner proteins. We tested the involvement in HCV entry of tetraspanins expressed in hepatocytes. Interestingly, we showed that CD151 is also involved in HCV entry. CD151 seems to play an indirect role in HCV entry through regulating membrane organization, especially by preventing CD81 clustering, which is unfavourable to HCV entry.

We also studied the effect of some entry factors polymorphisms on viral entry. In a cohort of drug users infected by HIV but not by HCV, we identified two mutations, R209Q in CLDN-6 and P24A in OCLN, not found in control or coinfecting patients. It is very rare for drug users patients infected by HIV not to be infected by HCV, suggesting a natural resistance of these patients to HCV infection. We hypothesized that the two mutations identified might impair HCV entry. However, the characterization of these mutations showed that they did not have a functional effect *in vitro*.

Finally, we investigated the effect of Monensin, a polyether ionophore, on viral entry. This molecule increases endosomal pH through its ions transfer properties across cell membranes. We showed that Monensin inhibits HCV entry through impairing the fusion step. Interestingly, HCV cell-to-cell transmission, another poorly characterized entry pathway, was also blocked by Monensin, suggesting that a pH-dependent fusion step is also required for this transmission route. We generated resistant mutants to Monensin, notably the FL-8 mutant carrying two mutations in envelope glycoproteins, namely Y297H in E1 and I399T in E2. Viral particles expressing these two mutations infected cells in a pH-independent manner, displayed different biophysical properties and were not cell-to-cell transmitted.

To conclude, these studies highlight the importance of membrane organization for viral entry through cell factors like CD151. We also pointed out that cell-to-cell transmission is a pH-dependent process. In addition, point mutations in E1 and E2 are sufficient to enable HCV to be pH-independent for its entry. However, polymorphisms in CLDN-6 and OCLN seem to have no effect on viral entry.

Introduction

I- L'HEPATITE C

L'hépatite C est une infection virale. Les hépatites virales conduisent à des inflammations du foie causées par des virus. Elles entraînent une nécrose partielle du parenchyme hépatique et sont caractérisées par une augmentation des transaminases dans le sang. Chez l'Homme on connaît aujourd'hui cinq hépatites virales : les hépatites A, B, C, D et E, causées par des virus génétiquement très différents et donnant des pathologies variables. Ainsi, les hépatites A et E sont presque uniquement aiguës et durent généralement moins de six mois, alors que les hépatites B, D (toujours associée à l'hépatite B) et C peuvent être chroniques et évoluent sur plusieurs années voire plusieurs dizaines d'années.

A- Epidémiologie

1- Prévalence

L'hépatite C est un problème majeur de santé publique puisque plus de 170 millions de personnes seraient infectées à travers le monde. Il est estimé que 3 à 4 millions de personnes sont nouvellement contaminées chaque année. Cependant, il est difficile d'avoir les chiffres exacts du nombre de personnes atteintes. D'une part, la plupart des patients infectés sont asymptomatiques et ne sont donc pas diagnostiqués. D'autre part, des biais existent dans les études réalisées et notamment dans le choix des cohortes. En effet, celles-ci sont souvent réalisées sur des groupes de patients à risque tels que les toxicomanes, les prisonniers ou les patients infectés par le HIV (Virus de l'Immunodéficiences Humaines), ce qui ne reflète pas toujours la prévalence dans la population générale.

La prévalence moyenne dans le monde est comprise entre 2 et 3%, mais varie d'une région du globe à l'autre, avec l'existence notamment d'un gradient Nord/Sud. Les pays occidentaux, notamment l'Europe occidentale et l'Amérique du Nord, présentent généralement une prévalence inférieure à 2,5% (Lavanchy, 2011). En revanche, cette prévalence dépasse les 5% dans certains pays d'Afrique et d'Asie et peut même dépasser les 10%. C'est notamment le cas de l'Egypte, qui présente la prévalence la plus forte

dans le monde, notamment à cause des campagnes de traitement de la bilharziose avec du matériel souillé (**Figure 1**).

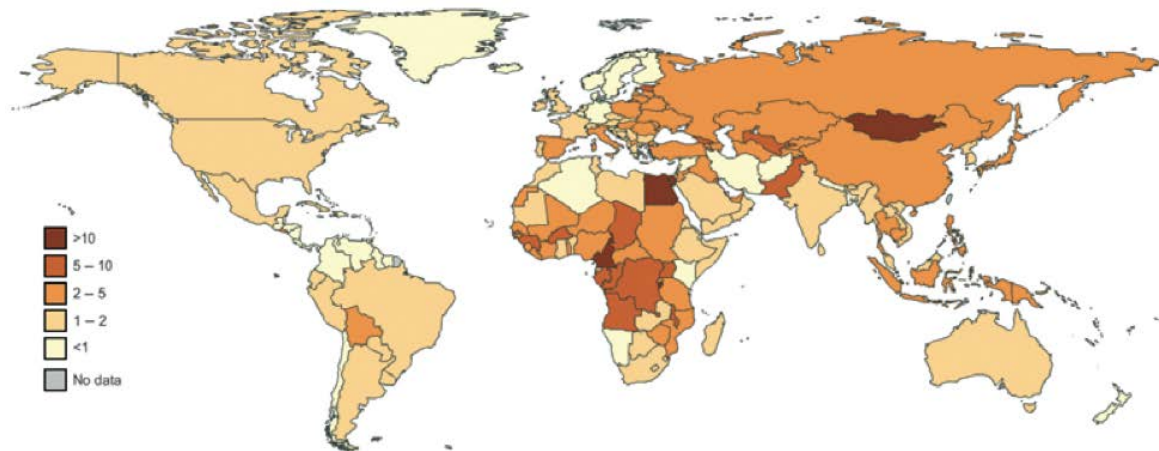


Figure 1 : Prévalence de l'hépatite C dans le monde.

(Lavanchy, 2011).

2- Voies de transmission

L'hépatite C est une maladie qui se transmet essentiellement par le sang et ses dérivés. Dans les années 1970 et 1980, la majorité des contaminations était due à des transfusions sanguines ou à du matériel médical mal stérilisé. En effet, avant le dépistage systématique dans les poches de sang, le risque de transmettre l'hépatite C de cette manière s'élevait à 0,45% par transfusion (Donahue *et al.*, 1992), ce risque étant aujourd'hui seulement de 1 pour 1 million de transfusions (Pomper *et al.*, 2003). Bien que les risques dus à des interventions médicales aient été considérablement réduits, certaines contaminations ont été observées sporadiquement. C'est ainsi le cas de patients en France ayant été traités pour des varices par sclérothérapie (de Lédighen *et al.*, 2007).

La majorité des infections aujourd'hui dans les pays occidentaux sont dues au partage de seringues usagées lors de l'injection de drogue par voie intraveineuse (Razavi *et al.*, 2014). Cependant, l'incidence de ces infections a été diminuée avec l'accès à du matériel stérile et grâce à une meilleure prise en charge des toxicomanes, notamment dans le cadre des campagnes de prévention contre le SIDA (Hurley *et al.*, 1997). L'incidence a également été diminuée grâce aux programmes de substitution à la méthadone, comme évalué dans une cohorte suisse (Wandeler *et al.*, 2012).

D'autres voies de transmission sont également possibles bien que minoritaires. Ainsi, les transmissions par voie sexuelle sont très rares dans le cadre de relations hétérosexuelles (Terrault *et al.*, 2013), mais celles-ci peuvent devenir significatives dans le cadre de rapports homosexuels non protégés entre hommes (Terrault, 2002). Des cas de transmission mère à enfant ont également été décrits dans 4% des naissances de mères infectées, mais restent relativement rares (Roberts & Yeung, 2002).

De manière intéressante, une étude menée sur des patients séropositifs pour le Virus de l'Hépatite C (HCV) dont l'historique excluait tout usage de drogues par voie intraveineuse et tout recours à une transfusion sanguine, a identifié des causes plus atypiques de la transmission de la maladie. Cette étude a ainsi montré que les avortements, les soins esthétiques, la manucure et la pédicure, les sports de contact ainsi que certains soins dermatologiques pouvaient transmettre la maladie. Par ailleurs, cette étude a confirmé la transmission de la maladie par le recours à l'acupuncture, à l'endoscopie digestive, ou encore à l'usage de cocaïne par voie nasale (Karmochkine *et al.*, 2006).

B- Evolution de la maladie

L'hépatite C est une maladie à évolution lente débutant par une infection aiguë, le plus souvent asymptomatique, et pouvant s'étendre sur 25 à 30 ans en cas de chronicité. L'évolution de cette maladie a pour conséquence le développement d'une fibrose qui dans 10 à 20% des cas va évoluer vers une cirrhose hépatique qui peut également évoluer vers le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) (**Figure 2**). L'infection par l'hépatite C peut également se compliquer avec des manifestations extra-hépatiques.

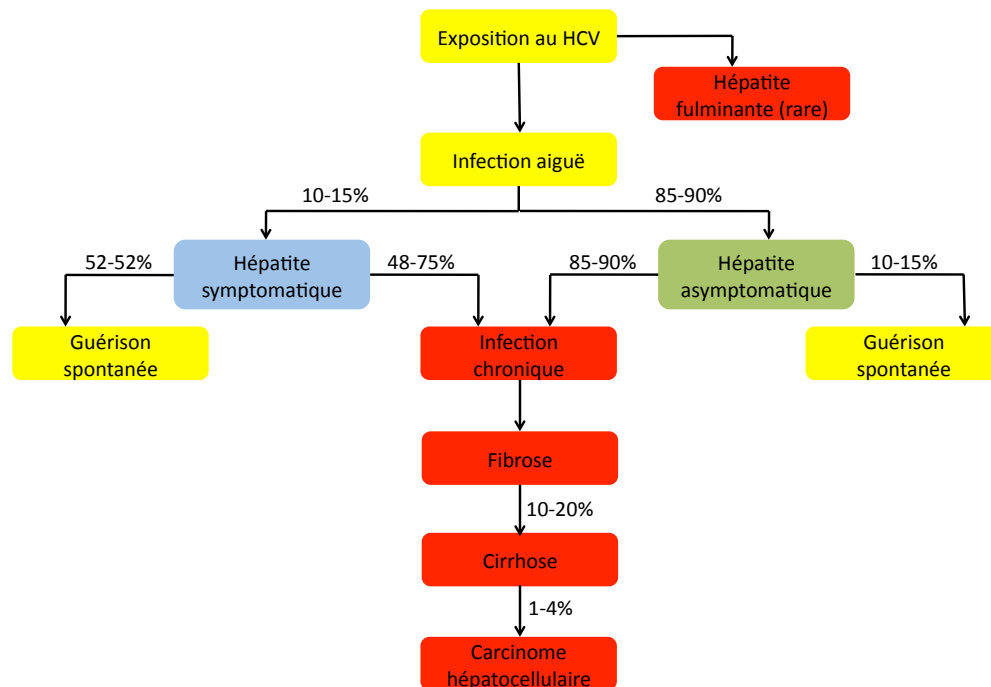


Figure 2 : Evolution de l'infection par l'hépatite C.

(D'après Gupta *et al.*, 2013)

1- Hépatite C aiguë

Dans environ 70 à 80% des cas, l'hépatite C aiguë est asymptomatique et pour cette raison, elle est rarement diagnostiquée. Elle est caractérisée par une élévation transitoire du taux de transaminases hépatiques (ALAT et ASAT) au moins 10 fois au-dessus de la normale. Lorsqu'elle est symptomatique, après une période d'incubation qui varie de 2 à 12 semaines, l'infection aiguë se caractérise par une asthénie, une anorexie, une dyspepsie, des urines sombres, une hépatomégalie et dans de rares cas, un ictère (Orland *et al.*, 2001). Ces symptômes ne sont toutefois pas typiques et sont partagés par les autres hépatites virales et peuvent également être dus à une réactivation d'une hépatite C chronique. Il arrive dans quelques rares cas que le patient développe une hépatite C fulminante, mortelle dans 80% des cas si le patient n'est pas transplanté immédiatement. Dans 50 à 84% des cas, l'hépatite C aiguë évolue vers la chronicité. La guérison spontanée, quand elle a lieu, est caractérisée par l'absence persistante d'ARN viral dans le sang des patients. La durée d'une infection aiguë est généralement inférieure à six mois.

2- Hépatite C chronique

L'hépatite aiguë évolue vers la chronicité dans 80% des cas en moyenne. L'évolution vers la chronicité ou la guérison spontanée dépend de nombreux facteurs à la fois génétiques et comportementaux. Ces facteurs seront détaillés ultérieurement (VI). L'infection persistante évolue lentement, parfois sur plusieurs décennies, et a pour conséquences essentiellement des pathologies du foie. En effet, si le HCV n'est pas un virus cytopathique, l'activation constante du système immunitaire lors de l'infection chronique au niveau du foie, en particulier des lymphocytes T, est supposée entraîner une inflammation constante du foie. Cette inflammation entraîne la formation d'un tissu cicatriciel constitué de dépôts de matrice extracellulaire et entraîne l'apparition d'une fibrose hépatique au cours du temps (Hernandez-Gea & Friedman, 2011). Il a également été suggéré que le stress oxydatif induit lors de l'infection pouvait être à l'origine du développement des fibroses (Cardin *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2001). Les perturbations induites par le HCV dans le métabolisme lipidique (Mirandola *et al.*, 2009) semblent également associer l'hépatite C au développement de stéatoses, une pathologie caractérisée par l'accumulation de triglycérides dans le foie (Machado *et al.*, 2011). Il a également été décrit qu'au bout d'une vingtaine d'années, 10 à 20% des hépatites C chroniques entraînent une cirrhose du foie (Hoofnagle, 2002). Une étude a montré qu'en moyenne 27% des cirrhoses dans le monde étaient dues au HCV (Perz *et al.*, 2006). L'infection chronique peut également mener, dans les trente ans suivant l'exposition initiale, au développement d'un CHC dans 1 à 4% des cas (El-Serag & Rudolph, 2007). Une étude a montré que 25% des CHC dans le monde étaient dus à l'hépatite C, ce qui, combiné aux nombreux cas de cirrhoses dus à cette maladie, fait de l'hépatite C la première cause de transplantations hépatiques dans le monde (Perz *et al.*, 2006). L'action combinée du stress oxydatif induit lors de l'infection pouvant causer des dommages de l'ADN chromosomique, ainsi que l'apoptose des cellules infectées promouvant la prolifération de cellules régénératrices, est vraisemblablement responsable du développement de CHC. De plus, l'interaction de certaines protéines virales avec des suppresseurs de tumeurs pourrait aussi jouer un rôle dans ce processus (Yamane *et al.*, 2013).

Enfin, l'hépatite C chronique peut également s'accompagner de différentes manifestations extra-hépatiques. Ainsi, l'activation chronique du système immunitaire

et l'interaction entre certaines protéines virales et des récepteurs du système immunitaire semblent être en cause dans le développement de cryoglobulinémies mixtes ainsi que dans des lymphomes non Hodgkiniens. Il a également été montré que des patients pouvaient développer une résistance à l'insuline et un diabète de type 2 consécutivement à l'infection par le HCV, mais le processus reste encore mal connu (Vanni *et al.*, 2009). Enfin, le fait que le HCV puisse infecter certaines cellules du système nerveux ainsi que les conséquences d'une insuffisance hépatique sur le système nerveux seraient à l'origine de manifestations nerveuses telles que des dépressions (Negro, 2014).

C- Diagnostic

L'infection par le HCV étant majoritairement asymptomatique, il est rare qu'elle soit diagnostiquée lors de la phase aiguë de l'infection. C'est souvent lors d'analyses sanguines via le dosage des transaminases hépatiques, lors de la palpation du foie ou lors de biopsies hépatiques, qu'une hépatite C peut être soupçonnée. Le dépistage est en revanche automatique pour toutes les poches de sang.

Plusieurs méthodes de diagnostic sont disponibles à l'heure actuelle. Tout d'abord des outils de diagnostic indirect ont été mis en place. Il s'agit de tests ELISA permettant de détecter dans le sérum des patients des anticorps dirigés contre différentes régions du génome. Plus récemment, un test rapide et simple à utiliser, OraQuick® HCV Rapid Antibody Test, permet à partir d'une simple goutte de sang de détecter des anticorps dirigés contre la protéine de capsid (encore appelée core) du HCV (Lee *et al.*, 2011). Cependant, la séroconversion n'ayant lieu que dans les 7 à 8 semaines suivant l'infection, d'autres méthodes permettant un dépistage plus précoce sont nécessaires.

Il s'agit des méthodes de diagnostic direct, visant à détecter directement le virus dans le sang du patient. C'est le cas de tests ELISA permettant de détecter et de quantifier certains antigènes viraux, en particulier la protéine core. La corrélation entre les niveaux de protéine core détectés et les niveaux d'ARN viraux (Descamps *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2010), rend ce test particulièrement intéressant pour évaluer la charge virale à moindre coût que celui de la quantification directe des ARNs viraux (Moscato *et al.*, 2011). En effet, des méthodes diagnostiques visant à détecter l'ARN viral ont été

développées. Ces méthodes sont sensibles et permettent un diagnostic plus précoce que la détection d'anticorps ou d'antigènes. Ainsi, des méthodes de RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) et de TMA (*Transcription-Mediated Amplification*) en temps réel permettent de quantifier respectivement des ADN double-brin et des ARN simple-brin, ce qui permet de mesurer la charge virale du patient (Ghany *et al.*, 2009).

Enfin, du fait des disparités dans la réponse aux différents traitements contre le HCV et du fait que certains traitements ciblent spécifiquement un génotype viral, le génotypage est un outil essentiel dans le diagnostic du patient. Pour cela, différents tests ont été développés et reposent essentiellement sur trois méthodes. La première est le séquençage d'une région donnée du génome. La seconde est l'hybridation à l'aide d'une sonde spécifique d'un génotype. Enfin, la troisième méthode consiste à réaliser une PCR nichée à l'aide d'amorces spécifiques d'un génotype (Chevaliez & Pawlotsky, 2012).

II- LE VIRUS DE L'HEPATITE C (HCV)

A- Découverte

Alors que depuis les années 1960 des outils existaient pour diagnostiquer le Virus de l'Hépatite A (HAV) et le Virus de l'Hépatite B (HBV), il apparaît rapidement dans les années 1970 que des cas d'hépatites virales, majoritairement post-transfusionnelles ne sont dues ni à HAV, ni à HBV. On parle alors d'hépatites « non A non B » (Feinstone *et al.*, 1975). Deux formes d'hépatites « non A non B » sont décrites, l'une se transmettant par voie parentérale et l'autre par voie entérale. Bien qu'il soit possible d'infecter des chimpanzés à partir des séra de patients infectés par un virus d'une hépatite « non A non B » parentérale (Bradley *et al.*, 1985), l'agent infectieux tarde à être isolé du fait de difficultés à le propager en culture cellulaire. Son génome est cloné pour la première fois en 1989, près de 15 ans après la description des hépatites « non A non B », il s'agit du HCV (Choo *et al.*, 1989). Le virus de l'hépatite E (HEV), responsable de l'hépatite « non A non B » transmise par voie entérale, a été quant à lui identifié peu après (Krawczynski & Bradley, 1989).

B- Classification

De part les similitudes qu'il partage avec les membres de cette famille, le HCV a été classé dans la famille des *Flaviviridae* du genre *Hepacivirus* (Choo *et al.*, 1991). Les *Flaviviridae* sont des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité positive non segmenté et possédant une capsidie icosaédrique. Les *Flaviviridae* comportent trois autres genres : les *Flavivirus* (virus de la dengue, virus de la fièvre jaune, virus West Nile, virus de l'encéphalite à tique), les *Pestivirus* (virus de la diarrhée bovine) et les *Pegivirus* (HPgV (anciennement GBV-C), SPgV (anciennement GBV-A)) (Scheel *et al.*, 2014). Les *Hepacivirus* diffèrent des autres genres de *Flaviviridae* notamment de part l'organisation de leur génome.

Pendant longtemps, il a été pensé que les *Hepacivirus* trouvaient leur origine chez les primates. En effet, le seul autre *Hepacivirus* connu était le GBV-B, un virus infectant le tamarin. Cependant, les récentes découvertes ont remis cette hypothèse en cause. En effet, récemment ont été découverts non seulement des *Hepacivirus* infectant les

rongeurs (RHV) et les chauves-souris, mais surtout des *Hepacivirus* infectant les chiens et les chevaux (NPHV), retrouvés partout dans le monde. Or, le HCV est plus proche génétiquement du NPHV que du GBV-B (Sheel *et al.*, 2014) (**Figure 3**).

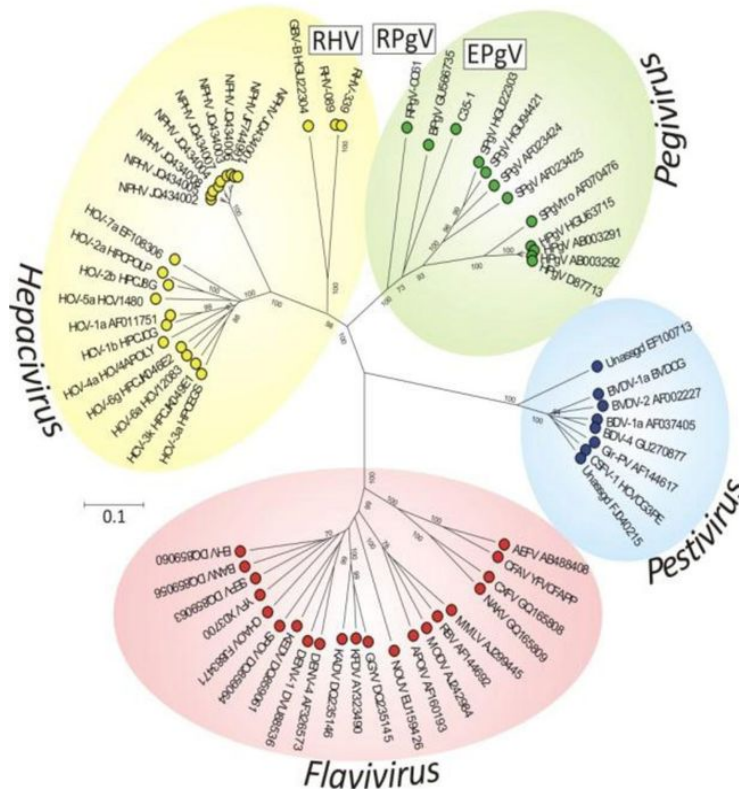


Figure 3 : Arbre phylogénétique des *Flaviviridae*.

L'analyse phylogénétique repose sur les comparaisons de séquence du gène codant l'hélicase virale (Kapoor *et al.*, 2013).

Le HCV présente une grande diversité et est lui même subdivisé en génotypes dont les séquences nucléotidiques divergent d'environ 30% et en sous-types viraux divergeant d'environ 20% (Sheel *et al.*, 2014). On dénombre aujourd'hui 7 génotypes et 67 sous-types répartis de façon différentielle dans le monde (Smith *et al.*, 2014). Ainsi, le génotype 1 est présent un peu partout dans le monde, alors que le génotype 2 est essentiellement retrouvé en Asie. Certains génotypes sont présents dans des zones plus restreintes. Ainsi le génotype 4 est largement majoritaire en Egypte, tandis que le génotype 5 est principalement retrouvé en Afrique du Sud (**Figure 4**) (Hajarizadeh *et al.*, 2013).

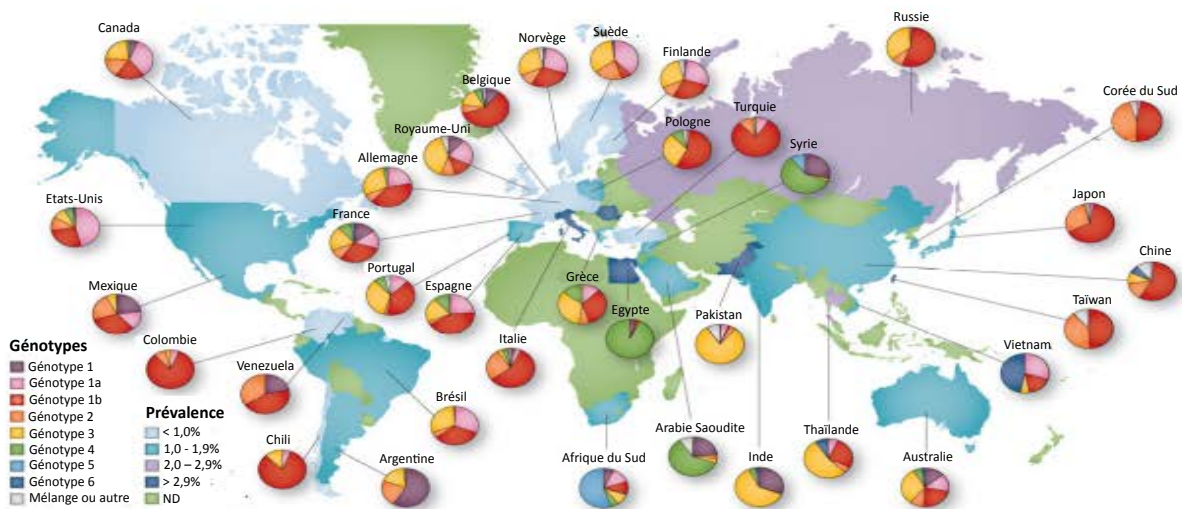


Figure 4 : Distribution géographique des génotypes du HCV.

(D'après Hajarizadeh *et al.*, 2013)

La grande diversité retrouvée chez le HCV est due dans un premier temps à sa polymérase. En effet, celle-ci ne possède pas de système d'édition et a une probabilité d'erreur par nucléotide et par réplication comprise entre 10^{-4} et 10^{-5} . Ce chiffre, ramené aux 10^{12} virions produits chaque jour par un individu chroniquement infecté, explique en partie la présence de quasi-espèces virales. Par ailleurs, le caractère majoritairement chronique de l'infection favorise l'établissement de quasi-espèces virales. Enfin, des phénomènes de recombinaisons intra- et inter-génotypiques ont également été observés, permettant donc une encore plus grande variabilité (Hoshino *et al.*, 2012; Kalinina *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2012; Yokoyama *et al.*, 2011). Cependant, ce processus reste limité par l'existence de mécanismes de prévention des superinfections au sein d'une cellule déjà infectée (Liu *et al.*, 2009; Tscherné *et al.*, 2007).

C- La particule virale

1- Structure et propriétés de la particule virale

Les particules virales isolées de séra de patients ou de chimpanzés infectés ont permis d'étudier leur structure ainsi que leurs propriétés biophysiques. Ceci a mis en évidence que le HCV se présente sous forme de petites particules de 50 à 80 nm de diamètre (Catanese *et al.*, 2013; Kaito *et al.*, 2014) ayant une grande hétérogénéité de densité. En effet, la densité des particules virales varie de 1,03 à 1,20 g/cm³ (André *et al.*,

2002; Pumeechockchai *et al.*, 2002). De manière intéressante, ce sont les particules de plus faible densité qui sont les plus infectieuses (Gastaminza *et al.*, 2006; Lindenbach *et al.*, 2006; Vieyres *et al.*, 2010). Ces différences de densité sont dues au fait que la particule virale est associée à des lipoprotéines (André *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2006; Thomssen *et al.*, 1992). En effet, l'assemblage et la sécrétion des particules se font en étroite relation avec la voie de sécrétion des VLDLs (*Very Low Density Lipoproteins*). Il a été montré entre autres que ApoA1 (apolipoprotéine A1), ApoB, ApoE et ApoC1 étaient incorporées par les particules virales et en réduisaient la densité (Catanese *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2007a; Gastaminza *et al.*, 2008; Meunier *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2013). On parle alors de lipoviriparticules. Cette association aux apolipoprotéines contribue à l'échappement de la particule virale au système immunitaire et en particulier aux anticorps neutralisants, en masquant en partie les glycoprotéines d'enveloppe. Elle aurait également un rôle dans les propriétés fusogènes de la particule virale (Haid *et al.*, 2009).

Les particules du HCV sont constituées d'une nucléocapside formée par l'oligomérisation de la protéine core associée à l'ARN génomique viral simple brin de polarité positive (ARN (+)). Cette nucléocapside est elle-même entourée d'une membrane lipidique d'origine cellulaire, l'enveloppe virale, dans laquelle sont ancrées des hétérodimères des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (Deleersnyder *et al.*, 1997; Dubuisson *et al.*, 1994; Vieyres *et al.*, 2010). Il a été suggéré que la lipoviriparticule pourrait avoir une structure hybride avec une partie formée par le virion et une partie constituée par les apolipoprotéines (Bartenschlager *et al.*, 2011a) (**Figure 5**).

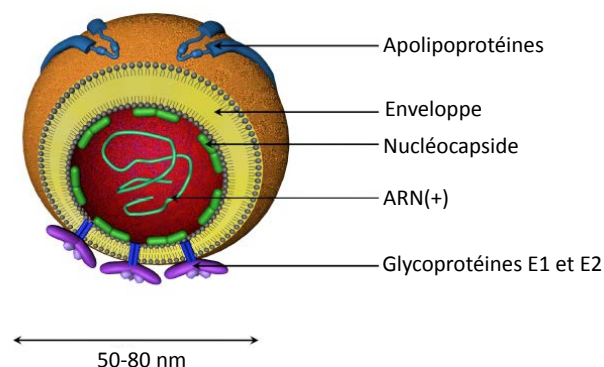


Figure 5 : Organisation de la lipoviriparticule du HCV.

2- Organisation de l'ARN génomique viral

a- Généralités

L'ARN génomique du HCV est un ARN simple-brin de polarité positive de 9,6 kb. Il est constitué d'un cadre de lecture unique (ORF) codant une polyprotéine d'environ 3010 acides aminés. Cet ORF est flanqué de deux régions non-codantes, les régions 3'- et 5'-UTR (UnTranslated Region). La polyprotéine est maturée par des protéases virales et cellulaires. Ainsi, les protéases cellulaires au niveau du réticulum endoplasmique (RE), les signal peptidases (SP) et les signal peptide peptidases (SPP), libèrent les protéines structurales tandis que les protéases virales NS2/3 et NS3/4A libèrent les protéines non-structurales. Cela aboutit à la libération de 10 protéines, dont 3 protéines structurales en N-terminal (la protéine de capsid core et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2) et 7 protéines non-structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B, la polymérase virale) en C-terminal (**Figure 6**). Les protéines NS3 à NS5B constituent la réplicase virale. Enfin, un décalage dans le cadre de lecture semble mener à l'expression d'une onzième protéine, la protéine F ou ARFP (*Alternative Reading Frame Protein*).

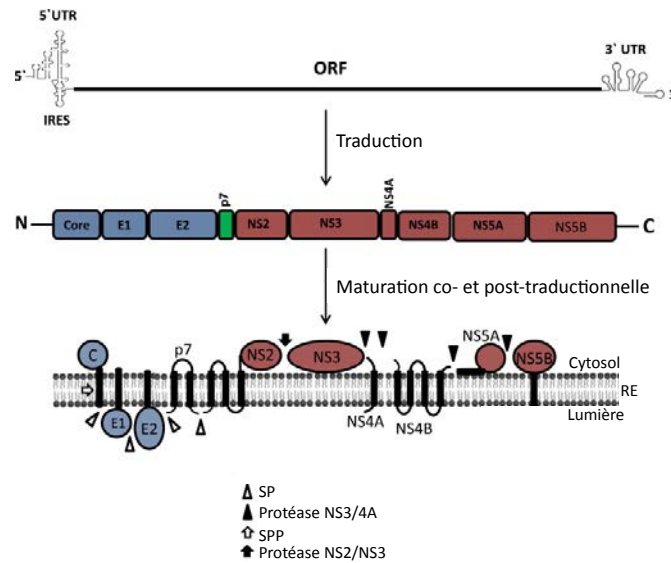


Figure 6 : Organisation génomique du HCV et maturation de la polyprotéine virale.

L'ARN(+) flanqué des régions 5'- et 3'-UTR est traduit grâce à l'IRES (Internal Ribosomal Entry Site) en une polyprotéine. Cette polyprotéine est maturée par des protéases cellulaires (SP et SPP) et virales (NS2/3 et NS3/4A). L'association membranaire des différentes protéines matures au niveau du RE est également représentée. Les protéines structurales sont indiquées en bleu et les protéines non-structurales en marron. La protéine p7, à l'interface entre les protéines structurales et non structurales est en vert (d'après Atoom *et al.*, 2014).

b- Les régions non-codantes

i) La région 5'-UTR

Les 340 premiers nucléotides en 5' de l'ARN génomique viral correspondent à une région non-codante, la 5'-UTR. Cette région comporte un IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), qui se prolonge jusqu'aux 42 premiers nucléotides du gène core (Honda *et al.*, 1996). Cet IRES comporte tous les éléments nécessaires à l'initiation de la traduction (Ji *et al.*, 2004; Kieft *et al.*, 2001; Pestova *et al.*, 1997). En effet, l'ARN génomique du HCV, à la différence des ARNm de l'hôte, n'est pas coiffé (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992). Ceci permet au virus d'échapper à certains mécanismes cellulaires entraînant une diminution de la traduction des protéines cellulaires et virales en réponse à une infection. De manière intéressante, l'IRES est la partie du génome viral la plus conservée parmi les différents génotypes (Soler *et al.*, 2002). C'est une région hautement structurée comportant 6 domaines (I à VI) eux-même divisés en sous-domaines (Collier *et al.*, 2002; Dibrov *et al.*, 2006; Lukavsky *et al.*, 2000; 2003) (**Figure 7**). Les domaines II, III et IV

sont essentiels pour le recrutement de la sous-unité 40S des ribosomes et les sous-domaines a, b et c du domaine III permettent la liaison avec le facteur de traduction eIF3 (*eukaryotic translation Initiation Factor 3*) (Kieft *et al.*, 2002).

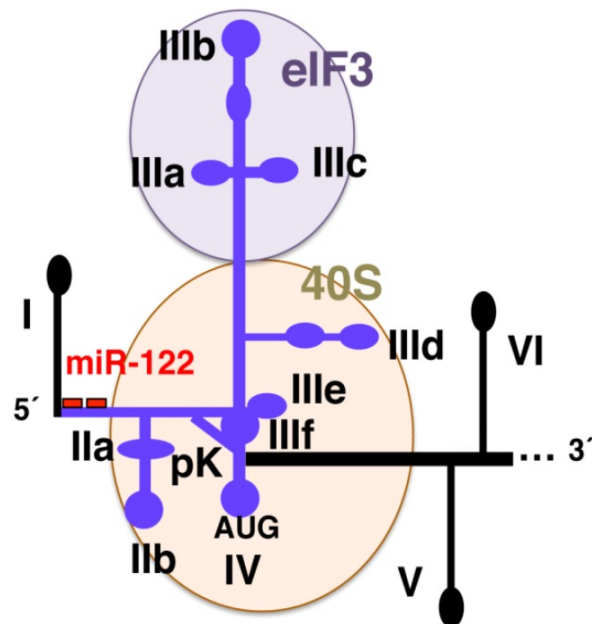


Figure 7 : Représentation schématique de l'IRES du HCV.

Les domaines I à VI de l'IRES ainsi que leurs sous-domaines respectifs sont représentés. Les domaines permettant le recrutement de la sous-unité 40S ribosomale et de eIF3 sont indiqués en violet. Les sites de fixation de miR-122 sont également indiqués. pK : pseudo-nœud (d'après Piñeiro & Martinez-Salas, 2012).

Par ailleurs, la région 5'-UTR possède deux séquences cibles en tandem du microARN miR-122 séparées par 8 ou 9 nucléotides entre les domaines I et II (Jopling, 2008). Le miR-122 est un microARN cellulaire essentiel au HCV qui, en stabilisant l'ARN viral, régule positivement la réplication et la traduction de la polyprotéine virale (Henke *et al.*, 2008; Roberts *et al.*, 2011).

ii) La région 3'-UTR

Les 200-235 derniers nucléotides de l'ARN viral constituent quant à eux la région 3'-UTR. Cette région comporte une séquence variable et, contrairement aux ARNm classiques, ne comporte pas de queue polyA mais une région polyU/C qui précède trois tiges-boucles terminales très conservées constituant la région dite 3'X (Kolykhalov *et al.*, 2000; Yanagi *et al.*, 1999). La région variable, la séquence polyU/C ainsi que la première tige-boucle de la région 3'X jouent un rôle d'amplificateurs de la traduction, en relation

étroite avec l'IRES (Song *et al.*, 2006). Une interaction entre les régions 5'-UTR et 3'-UTR via le domaine IIIId de l'IRES a été montrée, renforçant cette idée (Kumar *et al.*, 2013; Romero-López & Berzal-Herranz, 2009).

En plus de son rôle dans la traduction, la région 3'-UTR est aussi impliquée dans la réplication virale. Il a ainsi été montré que les régions conservées étaient nécessaires à la réplication du HCV (Kolykhalov *et al.*, 2000; Yi & Lemon, 2003). En effet, ces régions permettent l'interaction entre l'ARN génomique et différentes protéines de la réplicase virale. Ainsi, la seconde tige-boucle interagit avec une région structurée de l'ARN codant la protéine NS5B et cette interaction est essentielle pour la réplication virale (Friebe *et al.*, 2005). De plus, la troisième tige-boucle permet une interaction avec NS3 (Banerjee & Dasgupta, 2001). Enfin, la protéine NS5A peut se lier à la région polyU/C (Huang *et al.*, 2005).

c - Les protéines structurales

i) La protéine core

La protéine core, ou protéine de capsid, est une protéine très conservée, basique, capable de se lier à l'ARN génomique du HCV et permettant son encapsidation (Santolini *et al.*, 1994). Après avoir été libérée de la polyprotéine par une signal peptidase (SP) cellulaire, core est maturée par le clivage de son peptide signal en C-terminal permettant son adressage au RE par une peptide signal peptidase (SPP) cellulaire (McLauchlan *et al.*, 2002). La protéine core mature est constituée de 50% d'hélices- α , se présente sous forme de dimères (Boulant *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 1996; Nolandt *et al.*, 1997) et s'organise en deux domaines. Un premier domaine hydrophile, D1 (résidus 1 à 117), situé en N-terminal et riche en résidus chargés positivement, est impliqué dans la liaison à l'ARN et la dimérisation de core. Un second domaine hydrophobe, D2 (résidus 118 à 177), situé en C-terminal est quant à lui impliqué dans l'association aux gouttelettes lipidiques (GLs) et au RE (Barba *et al.*, 1997; Hope & McLauchlan, 2000; Rouillé *et al.*, 2006).

Core est une protéine essentielle à l'assemblage des particules virales infectieuses, non seulement de part son rôle structural, mais également via ses capacités à recruter le complexe de réplication au niveau des sites d'assemblage, notamment les

GLs, en interagissant avec des protéines du complexe de réplication (Masaki *et al.*, 2008; Miyanari *et al.*, 2007).

En dehors de son rôle dans l'encapsulation de l'ARN viral et dans l'assemblage, il a été montré que la protéine core, en interagissant avec des protéines cellulaires, pouvait affecter différents processus cellulaires. C'est ainsi que cette protéine régule l'expression d'un certain nombre de gènes et perturbe des voies de signalisation ainsi que le métabolisme lipidique. Il a en effet été montré que la protéine core inhibait la voie de signalisation NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) qui régule l'expression de nombreux gènes, notamment impliqués dans la réponse immunitaire innée (Shrivastava *et al.*, 1998). La protéine core est également capable de bloquer différentes voies d'apoptose, telles que celle médiée par le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*), ce qui contribuerait à la persistance virale (Marusawa *et al.*, 1999; Ray *et al.*, 1998). De plus, la protéine core a été impliquée dans le développement de stéatose hépatique (Moriya *et al.*, 1997) et de CHCs (Moriya *et al.*, 1998).

ii) Les glycoprotéines E1 et E2

E1 et E2 sont les protéines d'enveloppe du HCV. Elles sont impliquées dans de nombreuses étapes du cycle de réplication du HCV, notamment dans l'étape d'entrée, que ce soit en interagissant avec les facteurs d'entrée cellulaires ou au moment de la fusion, que dans l'assemblage de la particule. Ce sont des protéines hautement glycosylées de 160 et 360 acides aminés, respectivement. Ce sont des protéines transmembranaires de type I possédant chacune un domaine transmembranaire en C-terminal d'une trentaine d'acides aminés et un ectodomaine (**Figure 8**). Les domaines transmembranaires sont constitués de deux segments hydrophobes séparés par un segment polaire très conservé. Les domaines transmembranaires de E1 et E2 sont multifonctionnels. En plus de leur rôle d'ancrage membranaire, ils sont responsables de la rétention de E1E2 au niveau du RE et ils participent à la formation d'hétérodimères non covalents entre E1 et E2 (Ciczora *et al.*, 2005; Cocquerel *et al.*, 1998; 1999; 2000; 2003; Maurin *et al.*, 2011; Michalak *et al.*, 1997; Rouillé *et al.*, 2006). Cependant, il semblerait que les domaines transmembranaires ne soient pas les seuls à jouer un rôle dans cette hétérodimérisation. Ainsi, un motif de répétition heptade riche en leucines dans l'ectodomaine de E2 pourrait également être impliqué (Drummer & Pountourios,

2004). Les hétérodimères non covalents ont longtemps été décrits comme étant la structure fonctionnelle pour l'entrée virale (Bartosch *et al.*, 2003; Deleersnyder *et al.*, 1997), conférant ainsi un rôle des domaines transmembranaires dans l'entrée. Il a toutefois été montré plus récemment que les protéines E1 et E2 présentes à la surface des particules produites en culture cellulaire pouvaient former des complexes multimériques covalents stabilisés par des ponts disulfures. Les ectodomaines de ces protéines contiennent effectivement de nombreuses cystéines susceptibles de former des ponts disulfures (Vieyres *et al.*, 2010). La mutation de cystéines dans E1, et surtout dans E2, affecte considérablement l'infectiosité des particules virales (McCaffrey *et al.*, 2012; Wahid *et al.*, 2013). Par ailleurs, des mutations dans les domaines transmembranaires affectent les capacités de la particule virale à fusionner, conférant à ces domaines une importance également dans l'étape de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane d'un endosome (Ciczora *et al.*, 2007). De manière intéressante, les interactions entre E1 et E2 participent au bon établissement de la conformation de chacune d'entre elles (Brazzoli *et al.*, 2005; Cocquerel *et al.*, 2001; 2003; Michalak *et al.*, 1997).

La glycoprotéine E2 est caractérisée par la présence de deux régions hypervariables, HVR1 et HVR2 ainsi qu'une région variable intergénomique (IgVR), très variable d'un génotype à l'autre mais très conservée au sein d'un même génotype (Korenaga *et al.*, 2001; Polyak *et al.*, 1998) (**Figure 3**).

HVR1 regroupe les 27 premiers acides aminés de E2. Elle est impliquée dans l'entrée virale en se liant à des facteurs d'entrée du virus, notamment le Récepteur Scavenger de classe B de type 1 (SR-BI) (Bartosch *et al.*, 2003; Callens *et al.*, 2005; Scarselli *et al.*, 2002). HVR1 est également impliquée dans la liaison aux apolipoprotéines. Sa délétion entraîne une diminution de l'infectiosité des particules produites, parallèlement à une augmentation de leur densité et donc à une diminution de leur association aux lipoprotéines (Bankwitz *et al.*, 2010; Prentoe *et al.*, 2011). Il a ainsi été montré que l'association de ApoC1 aux particules virales augmentait leur taux de fusion et que ce mécanisme était modulé par HVR1 (Dreux *et al.*, 2007). HVR1 n'est toutefois pas indispensable et aurait probablement un rôle indirect dans l'entrée virale, puisque des mutants desquels cette région a été enlevée restent infectieux même si leur infectiosité est moindre. De plus, une mutation ponctuelle dans E1 est suffisante pour restaurer l'infectiosité de ces particules à leur niveau initial (Bankwitz *et al.*, 2010).

A la différence de HVR1, les rôles de HVR2 et IgVR sont beaucoup moins connus. Il semblerait toutefois que ces deux régions soient importantes pour la formation des hétérodimères ainsi que dans la modulation de la liaison entre E2 et les facteurs d'entrée du HCV, notamment CD81 (Albecka *et al.*, 2011; McCaffrey *et al.*, 2011).

Par ailleurs, de nombreux sites dans E2 ont été décrits comme faisant partie du domaine de liaison à CD81 ou comme pouvant, indirectement, jouer sur la conformation de la protéine et permettre *in fine* la liaison à ce facteur d'entrée. Il est en effet difficile de faire la distinction entre les deux mécanismes, en particulier en l'absence d'une structure parfaitement établie de E2. Ces sites ont été décrits en détails dans (Fénéant *et al.*, 2014) (Annexe).

Comme précédemment évoqué, E1 et E2 sont deux protéines hautement glycosylées. Elles comprennent respectivement jusqu'à 6 et 11 sites de N-glycosylation (Falkowska *et al.*, 2007; Goffard *et al.*, 2005; Helle *et al.*, 2007; 2010). Ces glycosylations participent au repliement des protéines et sont donc importantes pour l'assemblage (Choukhi *et al.*, 1998; Helle *et al.*, 2010). Le rôle des glycoprotéines dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales est renforcé par le fait que le remplacement des glycoprotéines E1 et E2 d'un génotype par celles d'un autre génotype puisse abolir l'enveloppement de la capsid (Steinmann *et al.*, 2013). L'ajout de N-glycanes permet de constituer un bouclier glycanique qui va permettre aux particules virales d'échapper à la réponse immunitaire spécifique de l'hôte en masquant les épitopes aux anticorps neutralisants (**Figure 8**). Cet échappement au système immunitaire est aussi médié par la variabilité de HVR1, région la plus immunogène, qui est aussi impliquée dans l'échappement à la réponse interférons (IFNs) (Abbate *et al.*, 2004; Grahovac *et al.*, 2000; Helle *et al.*, 2011; Pawlotsky *et al.*, 1999).

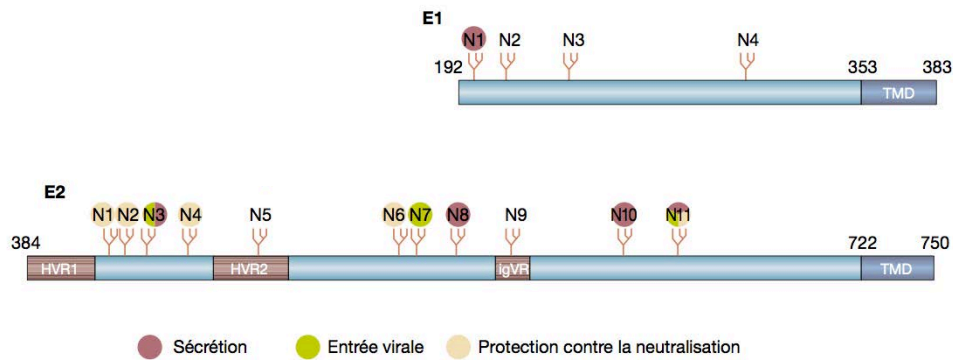


Figure 8 : Représentation des glycoprotéines E1 et E2.

E1 et E2 possèdent chacune un ectodomaine en N-terminal et un domaine transmembranaire (TMD) en C-terminal. E2 comprend 3 domaines variables : HVR1, HVR2 et IgVR. Les sites de N-glycosylation de ces deux protéines ainsi que leur implication dans la sécrétion, l'entrée ou l'échappement aux anticorps neutralisants sont indiqués (Helle *et al.*, 2007).

Le rôle des glycoprotéines E1 et E2 dans la fusion est sujet à de nombreuses controverses. Si leur implication est avérée (Haid *et al.*, 2009; Lavillette *et al.*, 2006; 2007; Russell *et al.*, 2009), il est plus difficile de savoir laquelle des deux protéines est la protéine de fusion. Pendant longtemps il a été supposé que les glycoprotéines d'enveloppe avaient une organisation structurale semblable à celle retrouvée chez les autres virus de la famille des *Flaviviridae*. Des alignements de séquences entre les séquences de E1 et E2 et celle de la protéine E du virus de la méningo-encéphalite à tiques (TBEV) ont été réalisés. Le but était de chercher à déterminer de E1 ou E2, laquelle était le plus probablement la protéine de fusion (Garry & Dash, 2003; Yagnik *et al.*, 2000), sans succès. Krey et collaborateurs, partant du postulat que E2 était la protéine de fusion et sur base des ponts disulfure prédits dans E2, ont établi un premier modèle de la structure de l'ectodomaine de E2, qui correspondait bien à la structure d'une protéine de fusion de classe II (Krey *et al.*, 2010). Cependant, ce modèle a été mis à mal récemment, lorsque la structure cristallographique d'une partie de E2 a pu être obtenue. Afin d'obtenir cette structure, certains sites de glycosylation ainsi que HVR1 ont toutefois dû être retirés de la protéine. Malgré tout, la protéine ainsi générée conserve ses facultés de liaison à CD81, est reconnue par différents anticorps neutralisants et est capable d'inhiber l'entrée du virus *in vitro* (Kong *et al.*, 2013). Ainsi, E2 possède une structure majoritairement globulaire constituée de courtes hélices- α , de boucles et de feuillets- β ainsi que d'un domaine central structuré en sandwich- β (**Figure**

9). Cette structure a été confirmée quelques mois plus tard par une autre équipe (Khan *et al.*, 2014).

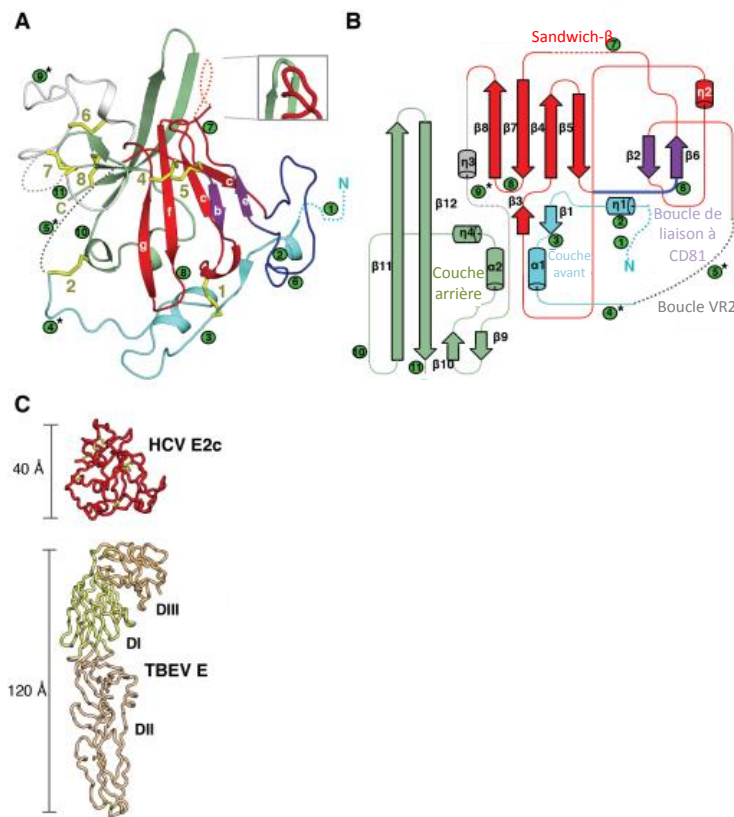


Figure 9 : Structure cristallographique de E2.

A) La structure cristallographique de l'ectodomaine de E2 sans HVR1 (E2c) est représentée. La couche avant en N-terminal est représentée en bleu, le feuillet extérieur (violet) et intérieur (rouge) forme le sandwich- β , la boucle de liaison à CD81 est en bleu, une région flexible (blanc) recoupe HVR2 (VR2), la couche arrière est indiquée en vert. Les ponts disulfures sont indiqués en jaune. Les sites de N-glycosylation sont indiqués dans des cercles verts. Les astérisques indiquent les sites de N-glycosylation ayant été mutés afin d'établir la structure cristallographique. Les régions désordonnées sont en pointillés. **B)** Représentation schématique de la structure de E2 suivant le même code couleur que précédemment. **C)** Comparaison entre la structure de E2 du HCV et la structure de E du TBEV, protéine de fusion de classe II (D'après Kong *et al.*, 2013&&&).

Si ces dernières données suggèrent que E2 n'est pas une protéine de fusion classique, elle possède toutefois des motifs impliqués dans la fusion, de même que E1. Ainsi, d'autres peptides de fusion potentiels, autres que ceux précédemment cités, ont été décrits dans E1 et E2 (Drummer *et al.*, 2007; Krey *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009; Russell *et al.*, 2009). Par ailleurs, récemment, la structure cristallographique de la région N-terminale de E1 jusqu'au résidu 79 a été déterminée. Cette région est formée d'une boucle β suivie d'une hélice α et de trois brins β formant un feuillet β antiparallèle. Cette

région N-terminale est capable de former des dimères, probablement via le brin β situé en C-terminal de cette région. Ces données ne sont toutefois pas compatibles avec l'hypothèse selon laquelle E1 serait une protéine de fusion de classe II (El Omari *et al.*, 2014). L'absence d'une conformation typique d'une protéine de fusion pour E2 et E1 et le fait que des déterminants de la fusion soient présents dans les deux protéines suggèrent que la protéine de fusion pourrait en réalité être constituée du complexe formé par E1 et E2 (Douam *et al.*, 2014; Lavillette *et al.*, 2007).

d- Les protéines non-structurales

i) La protéine p7

La protéine p7 est une petite protéine de 63 acides aminés située à la jonction entre les protéines structurales et non-structurales de la polyprotéine virale (Lin *et al.*, 1994). C'est une protéine présentant deux domaines transmembranaires reliés par une boucle cytoplasmique chargée positivement et des extrémités N- et C-terminales dans la lumière du RE (Carrère-Kremer *et al.*, 2002). Elle s'organise essentiellement en hexamères ou en heptamères (Chandler *et al.*, 2012; Clarke *et al.*, 2006; Luik *et al.*, 2009; StGelais *et al.*, 2009) et forme des canaux ioniques capables de transporter des cations à travers les membranes biologiques (Griffin *et al.*, 2003; 2004; Pavlović *et al.*, 2003), ce qui en fait une viroporine.

Les fonctions de p7 sont encore aujourd'hui méconnues mais il semble que cette protéine joue un rôle essentiellement dans l'assemblage du HCV. Des études *in vitro* ont montré que p7 était requise pour l'assemblage (Steinmann *et al.*, 2007; Wozniak *et al.*, 2010) et ces résultats ont été observés *in vivo* sur le chimpanzé (Sakai *et al.*, 2003). Une étude plus récente a montré que l'absence de p7 conduisait à l'accumulation de capsides incomplètes, n'ayant pas ou partiellement incorporé l'ARN viral, au niveau des GLs (Gentzsch *et al.*, 2013). Il a également été montré que p7 protégeait la glycoprotéine E2 d'une dégradation précoce par le protéasome au cours de l'assemblage (Atoom *et al.*, 2013), ce qui est en accord avec l'observation de la colocalisation entre ces deux protéines (Vieyres *et al.*, 2013a). Les mécanismes exacts restent inconnus mais il semble que l'activité de canal ionique soit essentielle aux fonctions de p7 sans pour autant être suffisante. En effet, lorsque p7 est délétée et complétée par une autre viroporine exprimée *in trans* telles que la protéine M2 du virus Influenza A ou la protéine Vpu du

HIV-1, l'assemblage des particules de HCV n'est pas restauré (Brohm *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été suggéré que de part son activité de canal ionique, et notamment de sa capacité à transporter les protons, elle permettrait d'empêcher l'acidification des compartiments où les virions sont assemblés, ce qui éviterait que des changements conformationnels induits par le pH n'en affectent l'infectiosité ultérieure (Atkins *et al.*, 2014; Gan *et al.*, 2014; Wozniak *et al.*, 2010).

ii) La protéine NS2

NS2 est une protéine de 217 acides aminés. La jonction entre NS2 et NS3 est clivée par l'activité protéase à cystéine de NS2 couplée à l'activité protéolytique de NS3 (Pallaoro *et al.*, 2001; Schregel *et al.*, 2009). Le site catalytique de cette activité protéase se situe dans la partie C-terminale de NS2, appelée NS2^{pro} et formant des dimères à deux sites actifs (Lorenz *et al.*, 2006). La partie N-terminale de NS2 est quant à elle constituée de trois domaines transmembranaires potentiels (Jirasko *et al.*, 2010).

Si NS2 n'a pas de rôle direct dans la réplication virale et ne fait pas partie de la réplicase (Lohmann *et al.*, 1999), elle reste cependant nécessaire à cette réplication en libérant NS3 grâce à son activité protéolytique. Par ailleurs, NS2 est importante pour l'assemblage du HCV en interagissant aussi bien avec les protéines structurales (E2) et non structurales (p7, NS3 et NS5A). Ceci permet en effet la colocalisation de ces protéines aux sites d'assemblage (Boson *et al.*, 2011; Jirasko *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011; Popescu *et al.*, 2011; Stapleford & Lindenbach, 2011). Ces résultats sont renforcés par une étude utilisant un mutant ponctuel de NS2 ayant montré que l'expression tardive en *trans* de la protéine NS2 fonctionnelle permettait de restaurer la production de particules virales infectieuses (Yi *et al.*, 2009). Une autre étude sur des mutants de NS2 a mis en évidence que la protéine était essentielle pour les étapes tardives de l'assemblage, notamment pour la sécrétion (la Fuente *et al.*, 2013).

iii) Le complexe NS3/4A

Les protéines NS3 et NS4A sont des protéines de 631 et 54 acides aminés respectivement. Ces deux protéines forment un complexe non-covalent où NS4A est un cofacteur de NS3. La protéine NS3 possède une activité protéase à sérine dans sa partie

N-terminale dont la structure est constituée de deux tonneaux- β (Kim *et al.*, 1996; Love *et al.*, 1996), et est stabilisée par un ion Zn^{2+} (Schregel *et al.*, 2009). Elle possède également une activité NTPase/hélicase dans sa partie C-terminale (Yao *et al.*, 1999). NS4A forme un complexe avec NS3 via un brin- β de la partie centrale de la protéine qui s'insère dans le tonneau- β en N-terminal de NS3 et permet d'assurer la bonne conformation du site catalytique (Brass *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 1996). Ce complexe est localisé au niveau de membranes, notamment celles du RE (Wölk *et al.*, 2000), mais également celles des mitochondries (Horner *et al.*, 2011), grâce à une hélice- α amphipatique en N-terminal de NS3 et à la partie N-terminale de NS4A qui forme une hélice- α transmembranaire (Brass *et al.*, 2008).

La première fonction de ce complexe est de libérer, par clivage protéolytique, le reste des protéines virales en aval de NS3 grâce à son activité de protéase à sérine. Il est donc primordial pour la réplication virale. De manière intéressante, ce complexe est également capable de cliver des protéines cellulaires, en particulier des protéines de la réponse immunitaire innée, notamment les protéines MAVS et TRIF de la voie de signalisation IFNs (IV A) 1).

L'activité hélicase de ce complexe permet de dérouler non seulement des ARNs double-brin mais aussi des régions d'ARN simple-brin ayant d'importantes structures secondaires en hydrolysant de l'ATP (Pang *et al.*, 2002). Cette activité requiert une structure dimérique de NS3 (Serebrov & Pyle, 2004). De manière intéressante, l'activité hélicase nécessite que le domaine protéase de NS3 soit présent (Frick *et al.*, 2004). Cette idée est renforcée dans une étude récente montrant qu'une mutation dans la séquence liant les domaines protéase et hélicase de NS3 augmentait la réplication virale mais supprimait l'infectiosité du HCV, suggérant un lien entre les activités des deux domaines (Kohlway *et al.*, 2014). Si cette activité hélicase semble importante aussi bien dans la réplication que dans l'assemblage, le mécanisme exact est encore inconnu. Il a été suggéré que l'activité hélicase pouvait être impliquée dans le déroulement de certaines structures secondaires de l'ARN viral afin d'en faciliter la réplication. Il a également été proposé que l'activité hélicase puisse aider à dissocier les brins d'ARN après la réplication (Lohmann, 2012).

Par ailleurs, la partie C-terminale acide de NS4A est capable d'interagir notamment avec les protéines de la réplicase virale via une hélice- α négativement

chargée. Cette interaction est essentielle pour la réplication virale ainsi qu'à l'assemblage de particules infectieuses (Lindenbach *et al.*, 2007; Phan *et al.*, 2011).

iv) La protéine NS4B

NS4B est une protéine de 261 acides aminés. C'est une protéine possédant 4 domaines transmembranaires dans sa partie centrale (Hügler *et al.*, 2001). Elle possède également deux hélice- α amphipatiques dans sa partie N-terminale, AH1 et AH2. AH2 pourrait traverser les membranes, notamment lorsque NS4B est sous forme d'oligomères (Gouttenoire *et al.*, 2010; Lundin *et al.*, 2003). En effet, cette protéine a la propriété de former des trimères, notamment via la palmitoylation de deux sites dans sa partie C-terminale (Yu *et al.*, 2006). Deux autres hélices α amphipatiques sont présentes dans la partie C-terminale de la protéine, H1 et H2. H2, de façon similaire à AH2, peut s'associer aux membranes cellulaires (Gouttenoire *et al.*, 2009).

Le rôle de NS4B est encore peu caractérisé mais cette protéine serait impliquée dans la réplication en interagissant avec des protéines non-structurales telle que NS5A (David *et al.*, 2015) ainsi qu'avec l'ARN viral (Einav *et al.*, 2004). Il a également été montré que cette protéine possédait une activité NTPase induisant l'hydrolyse de GTP et dont l'activité est nécessaire à la réplication virale (Einav *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2009). Par ailleurs, NS4B est aussi impliquée dans l'assemblage de la particule virale (Jones *et al.*, 2009).

NS4B est essentiellement localisée au niveau du RE (Gretton *et al.*, 2005; Hügler *et al.*, 2001; Lundin *et al.*, 2003), où elle est impliquée dans la formation du « *membranous web* », une altération des membranes du RE caractérisée par de nombreuses vésicules confinées, avec la formation de vésicules à double membranes, au niveau desquelles on retrouve le complexe de réplication virale (Egger *et al.*, 2002; Ferraris & Blanchard, 2010; Romero-Brey *et al.*, 2011). La formation du *membranous web* est dépendante de l'oligomérisation du NS4B puisque des mutations affectant la capacité de cette protéine à former des oligomères abolissent la formation de ce réseau membranaire. Il a alors été suggéré que les oligomères de NS4B pouvaient entraîner des incurvations de la membrane et donc les altérations observées dans le *membranous web*. Cependant, NS4B n'est pas la seule protéine virale impliquée dans ces altérations membranaires. En effet, la protéine exprimée seule ne permet pas d'obtenir une organisation membranaire

identique à celle obtenue en présence de l'ensemble des protéines virales. Ainsi NS3 et NS5A seraient aussi liées à ce processus (Paul *et al.*, 2013; Romero-Brey *et al.*, 2011).

v) La protéine NS5A

NS5A est une phosphoprotéine de 447 acides aminés. Deux formes de la protéine coexistent, une forme phosphorylée de 56 kDa et une forme hyperphosphorylée de 58 kDa. Elle possède une région d'ancrage aux membranes en N-terminal via une hélice- α amphipatique (Penin *et al.*, 2004) et est organisée en trois domaines (D1, D2 et D3) reliés par des régions de faible complexité structurale. Grace à son domaine d'ancrage et à sa capacité à interagir avec core, elle est localisée à l'interface entre le RE et les GLs (Brass *et al.*, 2002). Les sites d'hyperphosphorylation se trouvent dans la première région de faible complexité, entre D1 et D2, alors que les phosphorylations constitutives se situent dans la partie C-terminale et dans la partie centrale de la protéine. Les sites d'hyperphosphorylation semblent conférer à la protéine des capacités à moduler la réplication virale. En effet, les mutations d'adaptation qui apparaissent lors de la culture cellulaire du virus surviennent souvent au niveau de ces résidus ou dans des résidus pouvant affecter l'état d'hyperphosphorylation de la protéine. De plus, des inhibiteurs de kinases peuvent augmenter la réplication virale *in vitro* (Appel *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2004; Neddermann *et al.*, 2004). Il a été montré que des kinases cellulaires, la CKII (caséine kinase II) (Tellinghuisen *et al.*, 2008) ainsi que la CKI- α (Masaki *et al.*, 2014; Quintavalle *et al.*, 2007) étaient impliquées dans cette hyperphosphorylation. Cette régulation négative de la réplication par l'hyperphosphorylation de NS5A semble être liée à l'absence d'interaction entre la protéine hyperphosphorylée et la protéine cellulaire hVAP-A (human Vesicle-Associated Protein A), une protéine impliquée dans le trafic vésiculaire (Evans *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 1999). Plus récemment, il a été montré en microscopie confocale que certains résidus sérine phosphorylés étaient essentiels à la localisation cellulaire des protéines de la réplicase virale ainsi que des protéines cellulaires impliquées dans la réplication (Ross-Thriepland *et al.*, 2015).

Le domaine D1 est également impliqué dans la réplication. En effet, il est capable de se lier à des ARNs simple- et double-brins lorsque la protéine est sous forme de dimères (Hwang *et al.*, 2010; Moradpour *et al.*, 2005; Tellinghuisen *et al.*, 2005). Ce

domaine contient 4 cystéines permettant la coordination d'un ion Zn^{2+} nécessaire à la réplication (Tellinghuisen *et al.*, 2004; 2005).

Le second domaine, D2, joue également un rôle dans la réplication virale, mais n'en est pas un acteur indispensable. En effet, la suppression du domaine D2 de la protéine n'affecte pas la réplication (Appel *et al.*, 2005). De même, l'absence du domaine D3 ne perturbe pas la réplication virale (Appel *et al.*, 2005). Ce dernier domaine semble en effet impliqué essentiellement dans l'assemblage des particules virales (Appel *et al.*, 2008; Tellinghuisen *et al.*, 2008). De plus, le domaine D3 permet l'interaction avec la protéine core (Masaki *et al.*, 2008), renforçant l'importance du rôle de ce domaine dans l'assemblage. Il a par ailleurs été montré que les domaines D2 et D3 étaient capables d'interagir avec le site actif de la cyclophiline A (CypA) (Chatterji *et al.*, 2010b; Hanouille *et al.*, 2009; Verdegem *et al.*, 2011), une protéine jouant un rôle dans la réplication virale et potentiellement dans l'assemblage (Kaul *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009b).

De manière intéressante, des formes tronquées de NS5A ne présentant plus de région d'ancrage aux membranes ont été observées. Ces formes tronquées peuvent être adressées au noyau via un motif de localisation nucléaire en C-terminal de la protéine. Ceci suggère un rôle de cette protéine dans la régulation de l'expression des gènes de la cellule cible (Sato *et al.*, 2000). NS5A est également capable d'interagir avec de nombreuses protéines cellulaires, faisant d'elle une molécule clé dans les pathologies du foie associées à l'infection par le HCV (pour revue : Reyes, 2002).

vi) La protéine NS5B

NS5B, une protéine de 591 acides aminés est une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp). Elle permet aussi bien la formation des ARN(-) qui servent de matrice à la réplication virale, qu'à la synthèse des ARN(+) (Behrens *et al.*, 1996; Lesburg *et al.*, 1999; Lohmann *et al.*, 1997). C'est une polymérase qui possède *in vitro* une très faible activité catalytique (Lohmann *et al.*, 1998; Tomei *et al.*, 2000). Le domaine catalytique est constitué par les 530 acides aminés N-terminaux de la protéine et contient des motifs spécifiques de cette famille de polymérases. Ces motifs sont la présence d'une séquence GDD (Glycine-Acide aspartique-Acide aspartique) (Behrens *et al.*, 1996) ainsi qu'une organisation en trois domaines, commune à l'ensemble des polymérases, en forme de « main droite » avec des domaines « doigts », « paume » et

« pouce » (Bressanelli *et al.*, 1999; Lesburg *et al.*, 1999) (**Figure 10**). Deux résidus acide aspartique, Asp220 et Asp318, situés dans la « paume » permettent de coordonner des ions métalliques essentiels à la polymérisation des ARNs.

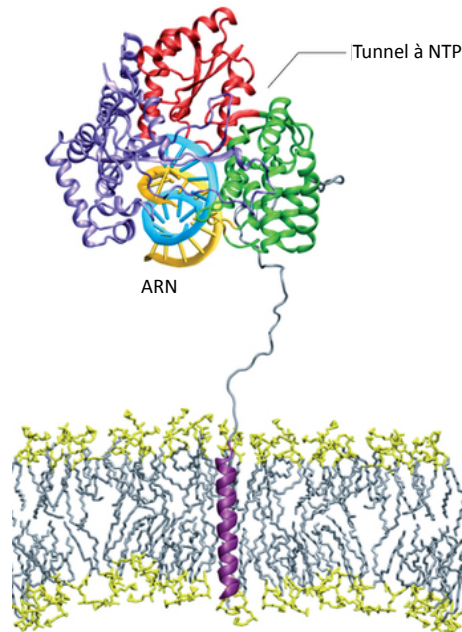


Figure 10 : Structure de la polymérase virale NS5B.

Le domaine doigts est en violet, le domaine paume en rouge et le domaine pouce en vert (d'après Bartenschlager *et al.*, 2013).

La matrice vient se loger dans le sillon fermé, formé à l'interface entre les « doigts » et le « pouce », menant jusqu'au site actif situé dans la « paume » où sont également acheminés les NTPs. La RdRp du HCV est une polymérase peu fidèle ne comportant pas de mécanisme d'édition en cas d'erreur, ce qui contribue à la formation de quasi-espèces virales. La faible activité de la protéine *in vitro* suggère que cette activité est modulée grâce à des interactions avec d'autres protéines. En effet, cette protéine est capable d'interagir avec un certain nombre de protéines. Ainsi, l'activité de la RdRp est modulée par son interaction avec certaines protéines virales, notamment NS5A (Shirota *et al.*, 2002), mais aussi avec des protéines cellulaires. Ainsi la cyclophiline B stimule l'activité de la RdRp en augmentant la liaison entre l'ARN et NS5B pour certains génotypes du HCV (Heck *et al.*, 2009; Watashi *et al.*, 2005). NS5B est aussi capable de lier d'autres protéines cellulaires, perturbant certaines voie de signalisation comme celle induite par le TNF- α via une modulation de l'I κ B kinase (Choi *et al.*, 2006).

Les 21 acides aminés C-terminaux restants contiennent un domaine transmembranaire formé par une hélice- α , permettant l'ancrage à la membrane de NS5B au niveau du RE (Schmidt-Mende *et al.*, 2001). Si cette partie de la protéine n'est pas nécessaire à l'activité de la polymérase en elle-même, en revanche, dans un contexte où l'ensemble des protéines de la réplicase est exprimé, ce domaine est indispensable à la réplication virale, potentiellement à travers des jeux de conformations (Moradpour *et al.*, 2004).

vii) La protéine F

La protéine F (ou ARF (*Alternative Reading Frame*)) est une protéine issue de la traduction d'un cadre de lecture alternatif recoupant la séquence du gène de la protéine core (Walewski *et al.*, 2001). La première mise en évidence de la fonctionnalité de ce cadre de lecture alternatif *in vivo* a consisté en la production *in vitro* de peptides de la protéine F afin de les utiliser comme antigènes pour détecter des anticorps spécifiques dans des séra de patients infectés (Xu *et al.*, 2001).

Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer le fonctionnement de ce cadre de lecture alternatif. Il semblerait ainsi que la traduction démarre au codon AUG du gène codant la protéine core, mais elle serait suivie d'un décalage du complexe ribosomal vers une région riche en adénosine, entre les codons 9 et 11 de core (Roussel *et al.*, 2003; Yeh *et al.*, 2000). Un décalage au niveau du codon 42 a également été décrit (Boulant *et al.*, 2003). Il a aussi été montré qu'un codon AUG interne dans la séquence de core (positions 85-87) pouvait initier la traduction d'une protéine F plus courte (Vassilaki & Mavromara, 2003). D'autres sites d'initiation de la traduction ont été décrits expliquant une importante diversité dans la taille des protéines F (Baril & Brakier-Gingras, 2005; Branch *et al.*, 2005). Par ailleurs, ces mécanismes sont dépendants du génotype viral car dépendants de certaines séquences.

La difficulté à détecter cette protéine dans un contexte infectieux fait que ses fonctions sont encore méconnues et controversées. Quelques études ont suggéré un rôle de la protéine F dans les processus de pathogenèse (Basu *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2008a), ainsi que dans la modulation de la réponse immunitaire (Fiorucci *et al.*, 2007). Il a été suggéré que certains rôles attribués à la protéine core dans la perturbation de différents processus cellulaires pourraient en réalité être attribués à la protéine F. Cependant, en

raison de la faible stabilité de la protéine, cette hypothèse reste difficilement vérifiable (Roussel *et al.*, 2003; Vassilaki *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2003).

D- Modèles d'étude

1- Débuts

Pendant longtemps aucun système de culture cellulaire n'était disponible pour étudier le cycle de réplication du HCV. En effet, les réinfections à partir de séra de patients ou l'utilisation d'hépatocytes primaires humains (PHH) infectés issus de patients donnaient des résultats extrêmement limités (Iacovacci *et al.*, 1993; 1997; Nakajima *et al.*, 1996; Seipp *et al.*, 1997; Tagawa *et al.*, 1995). Les premières tentatives du clonage de l'ARN génomique viral et de sa transfection en culture cellulaire n'ayant pas été concluantes (Blight *et al.*, 2000; 2003), d'autres systèmes ont été développés.

Les premiers systèmes disponibles permettaient seulement une étude partielle du cycle viral. Ainsi, le développement des réplicons subgénomiques et génomiques a permis d'étudier la traduction et la réplication du virus. Les réplicons subgénomiques comprennent la région des protéines non-structurales de NS2 ou NS3 à NS5B ainsi que les régions non-codantes 5' et 3' (Lohmann *et al.*, 1999). Ces réplicons peuvent être bicistroniques lorsque les gènes des protéines virales sont contrôlés par l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) tandis qu'un gène de résistance à un antibiotique telle que la néomycine ou un gène rapporteur comme la luciférase sont sous le contrôle de l'IRES du HCV. Des réplicons mono-cistroniques sous contrôle uniquement de l'IRES du HCV ont également été générés (**Figure 11**). Sur le même modèle, des réplicons génomiques ont été développés. Bien qu'ils contiennent tous les gènes viraux, ils sont incapables de produire des particules infectieuses, probablement dû à l'absence de mutations d'adaptation (Blight *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2002; Pietschmann *et al.*, 2002).

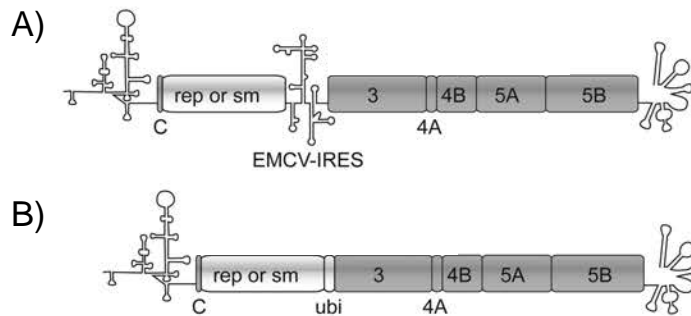


Figure 11 : Organisation des réplicons subgénomiques.

A) Réplicon bi-cistronique. Les gènes des protéines non-structurales sont sous le contrôle de l'IRES de l'EMCV tandis que le gène rapporteur (rep) ou le marqueur de sélection (sm) sont sous le contrôle de l'IRES du HCV fusionné aux 12 premiers acides aminés de la protéine core. **B)** Réplicon mono-cistronique. Les gènes des protéines non-structurales ainsi que le gène rapporteur ou le marqueur de sélection sont sous le contrôle de l'IRES du HCV (d'après Lohmann & Bartenschlager, 2014).

Alors que les réplicons permettent l'étude de la réplication virale, le premier outil utilisé pour tenter d'identifier les facteurs d'entrée du virus a été la production de formes recombinantes tronquées de la glycoprotéine E2 afin de la rendre soluble (Flint *et al.*, 2000; Michalak *et al.*, 1997). Cependant, la conformation de ces protéines ne correspondait pas à la conformation E2 native au niveau de la particule virale, en particulier à cause de l'absence de la formation d'un complexe avec E1 (Cocquerel *et al.*, 2003; Deleersnyder *et al.*, 1997; Op De Beeck *et al.*, 2004; Owsianka *et al.*, 2001; Vieyres *et al.*, 2010). C'est toutefois grâce à ce système qu'à été suggéré pour la première fois l'importance de CD81 dans le cycle de réplication du HCV (Pileri, 1998).

D'autres outils ont ensuite été développés afin d'étudier l'encapsidation de l'ARN viral ainsi que l'assemblage et l'entrée notamment, ce sont les pseudovirions ou VLPs (*Virus-Like Particle*). Ces VLPs consistent en l'expression des protéines structurales dans différents systèmes cellulaires, soit des cellules d'insectes via des baculovirus recombinants (Baumert *et al.*, 1998) soit des cellules de levures telle que *Pichia pastoris* (Bissig *et al.*, 2010; Falcon *et al.*, 1999). Cependant, ces systèmes ont l'inconvénient de ne pas présenter les mêmes profils de glycosylation des glycoprotéines d'enveloppe produites dans des cellules de mammifère (Clayton *et al.*, 2002).

Egalement et toujours pour étudier l'entrée virale, des virus de la stomatite vésiculaire (VSV), dans lesquels E1 et E2 ont été fusionnées à la glycoprotéine G du VSV ont permis de générer des virus recombinants pseudotypés par les glycoprotéines du

HCV. Cependant, les conformations des glycoprotéines sont différentes de celles présentes dans les particules natives du HCV, notamment à cause de l'absence de leur domaine transmembranaire, empêchant ainsi leur interaction (Buonocore *et al.*, 2002; Matsuura *et al.*, 2001).

Enfin, des virosomes ont été générés afin d'étudier l'étape d'attachement du virus. Les glycoprotéines d'enveloppe sont produites et les hétérodimères E1E2 ayant une conformation correctes sont sélectionnés à l'aide d'anticorps conformationnels et introduits à la surface de liposomes (Lambot *et al.*, 2002).

2- HCVpp

Il aura fallu attendre 2003 pour disposer d'un modèle réellement performant pour étudier l'entrée du HCV. Ainsi, le développement de particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines du HCV (HCVpp) ont permis pour la première fois l'étude de l'ensemble des étapes d'entrée du virus (Bartosch *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003). Ces particules sont produites par la transfection simultanée de trois plasmides dans des cellules HEK-293T. Un premier plasmide code les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 tandis qu'un second plasmide code les protéines Gag-Pol d'un *Retrovirus*, le virus de la leucémie murine (MLV), codant notamment les protéines de capsid et les protéines permettant la rétrotranscription du génome viral dans les cellules cibles. Enfin, un troisième plasmide contient un minigénome viral codant un gène rapporteur flanqué des séquences LTRs (*Long Terminal Repeat*) du MLV, permettant d'une part l'encapsidation de l'ARN viral et d'autre part son incorporation dans les cellules cibles. Les particules ainsi produites sont pseudotypées par les glycoprotéines E1 et E2 et permettent un cycle d'infection unique de lignées cellulaires hépatocytaires telles que les cellules Huh-7 (**Figure 12**). Le niveau d'infection est alors quantifié grâce au gène rapporteur. L'utilisation de plasmides codant les glycoprotéines E1 et E2 des différents génotypes ont permis de produire des HCVpp pseudotypées par une grande diversité de génotypes viraux, avec toutefois des efficacités variables (Meertens *et al.*, 2008).

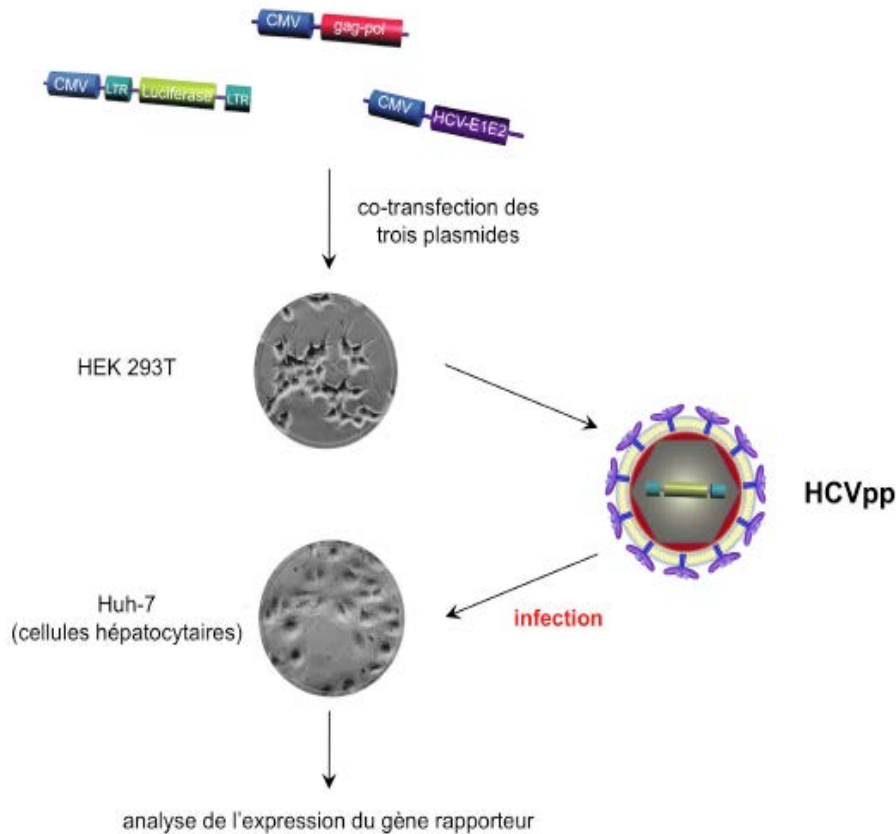


Figure 12 : Production des HCVpp.

Un plasmide codant les glycoprotéines d'enveloppe, un autre codant les protéines gag-pol du MLV ainsi qu'un plasmide codant un minigénome viral exprimant le gène rapporteur de la luciférase flanqué des séquences LTRs du MLV, sous contrôle du promoteur du cytomégalovirus humain (CMV), sont cotransfectés dans des cellules HEK-293T. Des particules virales ayant encapsidé le minigénome viral et pseudotypées par E1 et E2 sont alors produites. Ces particules permettent d'infecter des cellules Huh-7 en un cycle d'infection unique. Les cellules infectées expriment alors le gène rapporteur inséré dans leur génome.

Cependant, les HCVpp ne simulent pas complètement l'étape d'entrée. En effet, les cellules 293T ne permettent pas l'association des particules avec des lipoprotéines. Or, l'assemblage des particules du HCV est intimement lié à la voie de sécrétion des VLDLs dans les hépatocytes (Gastaminza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007a). Ceci aboutit normalement à l'incorporation d'apolipoprotéines (Apo) dans les particules virales telles que ApoE, ApoC1, ApoB et ApoA-1 (Catanese *et al.*, 2013; Popescu & Dubuisson, 2009).

3- HCVcc

Ce n'est qu'en 2005 qu'est développé un système permettant une amplification efficace en culture cellulaire du HCV (Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). Ces particules (HCVcc pour HCV produit en culture cellulaire) sont produites par transfection dans des cellules hépatocytaires humaines (Huh-7), d'un ARN génomique de la souche de HCV isolée chez un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante (JFH1 pour *Japanese Fulminant Hepatitis 1*) de génotype 2a. Ces particules sont infectieuses dans des lignées cellulaires hépatocytaires, dans les PHHs ainsi que dans des modèles animaux (**Figure 13**). Ces particules ont permis d'étudier pour la première fois l'ensemble du cycle viral. De manière intéressante, des mutations d'adaptation, permettant d'augmenter les titres infectieux ont été identifiées. Ces mutations sont présentes à la fois dans les protéines structurales et non structurales, notamment dans p7 et NS2 (Delgrange *et al.*, 2007; Kaul *et al.*, 2007; Russell *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2006), ainsi que dans les protéines de la répliqueuse, en particulier NS3 et NS5A (Gottwein *et al.*, 2009; Kaul *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2006).

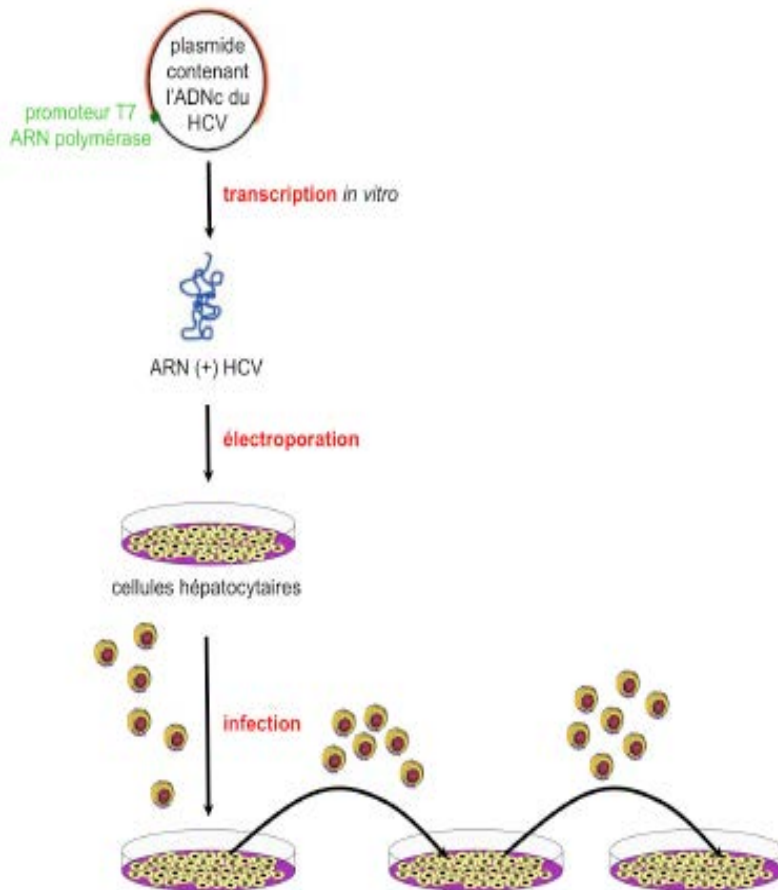


Figure 13 : Production des HCVcc.

L'ADNc du virus JFH1 est transcrit *in vitro* en ARN. Cet ARN est transfecté dans des cellules Huh-7 qui vont alors produire des particules infectieuses. Ces particules virales permettent d'infecter de nouvelles cellules.

Par la suite, d'autres souches virales ont pu être amplifiées en culture cellulaire grâce à des mutations d'adaptation. C'est le cas du H77S, appartenant au génotype 1a, bien que la production de particules infectieuses ne soit que partiellement efficace (Li *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2006), mais aussi de la souche J6 appartenant au génotype 2a tout comme le JFH1 (Li *et al.*, 2012).

Afin de disposer de modèles pour l'ensemble des génotypes, des chimères intergénomiques ont été générées. Pour cela, les constructions comprennent généralement les protéines structurales d'un génotype donné et les protéines non-structurales ainsi que la région 3'-UTR du JFH1 (Gottwein *et al.*, 2011; Scheel *et al.*, 2011).

Ces systèmes présentent cependant des limites. En effet, comme nous l'avons vu, les constructions ont besoin de mutations d'adaptation afin de pouvoir soutenir une réplication virale efficace en culture cellulaire, ce qui peut ne pas complètement refléter le comportement des virus natifs ne présentant pas ces mutations.

Un autre système, dérivé des HCVcc a été développé afin d'une part de découpler l'étape d'assemblage et l'étape d'entrée, mais aussi afin de développer un système présentant de moindre risques lors de sa manipulation. Ce système est basé sur particules de HCV trans-complémentées (HCVtcp) et consiste en la transfection d'une part d'un réplicon subgénomique et d'autre part d'un « virus helper » ou seulement des gènes des protéines structurales afin de restaurer l'assemblage. Ceci permet la formation de particules capables d'un seul cycle de réplication, de la même manière que les HCVpp. Ces particules sont particulièrement intéressantes dans le cadre du développement d'un vaccin en permettant de délivrer les protéines structurales du virus sans risque (Adair *et al.*, 2009; Steinmann *et al.*, 2008).

4- Cellules permissives

Actuellement, les lignées cellulaires les plus permissives à l'infection par le HCV et permettant les niveaux de réplication et les productions de particules virales infectieuses les plus efficaces sont les cellules Huh-7, des cellules hépatocytaires, ainsi que leurs sous-clones. C'est le cas ainsi en particulier des cellules Huh-7.5, défectueuses pour la voie de signalisation IFNs RIG-I, essentielle dans la réponse immunitaire innée contre le HCV (Sumpter *et al.*, 2005). D'autres lignées cellulaires hépatocytaires permettent une réplication virale. C'est le cas des cellules HepG2 (Narbus *et al.*, 2011) ou des cellules HuH-6 (Windisch *et al.*, 2005), mais aussi de cellules dérivant d'autres organes telles que les cellules HEK-293 (Ali *et al.*, 2004) ou HeLa (Zhu *et al.*, 2003). Cependant la réplication virale est souvent limitée par le défaut d'expression de mir122 ou de ApoE dans ces cellules, ainsi que de certains facteurs d'entrée permettant un cycle de réplication complet. Il a été par ailleurs observé que les particules produites en cellules Huh-7 étaient différentes de celles produites *in vivo* si l'on s'intéresse à leur profil d'association aux lipides (Bartenschlager *et al.*, 2011a; Scholtes *et al.*, 2012).

Le défaut principal de ces modèles cellulaires est que ces cellules, à la différence des hépatocytes ne sont pas polarisées. A ce titre, les PHHs sont un bon modèle mais restent non seulement difficiles à obtenir, mais présentent une diversité génétique importante d'un patient à l'autre et les niveaux de réplication virale peuvent varier considérablement (Podevin *et al.*, 2010). Les cellules HepG2 exprimant CD81 en *trans*, se polarisent avec le temps en formant des canalicules biliaires, et les cellules Caco-2 qui peuvent se polariser, sont une bonne alternative aux PHHs (Harris *et al.*, 2013; Mee *et al.*, 2009; 2010). Cependant, les taux d'infection dans ces cellules restent faibles.

5- Modèles animaux

a- Chimpanzés

Le chimpanzé commun (*Pan troglodytes*) est le modèle animal qui a historiquement contribué à l'étude du HCV alors que l'agent responsable n'avait pas encore été identifié. Naturellement, seul l'Homme peut être infecté par le HCV. Cependant, le chimpanzé est le seul primate non humain pouvant artificiellement être infecté par ce virus, que ce soit par inoculation intraveineuse de séra de patients (Alter *et al.*, 1978; Tabor *et al.*, 1978), ou de virus produits en culture cellulaire (Lindenbach *et al.*, 2006; Wakita *et al.*, 2005). De plus, les chimpanzés infectés par le HCV développent une évolution similaire à celle se déroulant chez l'Homme. En effet, il est observé une hépatite aigue, bien que généralement moins importante que chez l'Homme, et un certain nombre d'animaux évolue vers une infection chronique. L'infection chronique est cependant moins fréquente chez cet animal (Abe *et al.*, 1992; Bassett *et al.*, 1998). Ceci en fait le modèle idéal pour l'étude de la pathogenèse virale. Ce modèle a ainsi été particulièrement utile dans l'étude de la réponse immunitaire au HCV. En particulier, les chimpanzés ont permis de montrer qu'une infection par le HCV ne permettait pas de développer une immunité protectrice totale face à des infections ultérieures (Farci *et al.*, 1992; Prince *et al.*, 1992). Ce modèle a également été utile pour tester certaines thérapies sans IFN- α (Olsen *et al.*, 2011), ainsi que pour tester certaines préparations vaccinales (Choo *et al.*, 1994; Folgori *et al.*, 2006).

Ce modèle présente toutefois quelques différences avec l'infection chez l'Homme. Entre autres, le chimpanzé infecté chroniquement ne développe ni fibrose, ni cirrhose, ni

CHC, des complications à prendre en compte chez l'Homme dans l'évolution et le traitement de la maladie. Par ailleurs, en raison des coûts et des difficultés d'acquisition et d'entretien ainsi que des restrictions d'ordre éthique de plus en plus importantes, des modèles alternatifs ont du être développés et aujourd'hui le chimpanzé est extrêmement peu utilisé.

b- Toupayes

Les toupayes (*Tupaia belangeri*) sont de petits mammifères proches des primates présents en Asie du Sud Est appartenant à la famille des *Tupaïidés*. Il a été montré plus tardivement que pour le chimpanzé que cet animal pouvait être infecté par le HCV (Xie *et al.*, 1998). Cependant, dans cette étude moins de 30% des animaux parviennent à développer une virémie transitoire ou intermittente et aucun ne développe une infection persistante après infection à partir de séra de patients infectés. De plus, les animaux doivent être préalablement irradiés afin de les rendre plus sensibles à l'infection, via une diminution de leur réponse immunitaire. Cependant, des études plus récentes utilisant des HCVcc produits en culture cellulaire ou des séra de patients ont montré un taux d'infection de plus de 80% des toupayes et ce sans irradiation préalable (Amako *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2007). De plus, contrairement aux chimpanzés, les toupayes développent des lésions au niveau du foie suite à l'infection par le HCV, telles que des stéatoses ou des fibroses (Amako *et al.*, 2010). Ces résultats sont encourageants pour l'utilisation de ces animaux comme modèle. De plus, ces résultats sont supportés par des études ayant montré que des hépatocytes primaires de toupayes pouvaient être infectés à partir de séra de patients infectés par le HCV en donnant une infection productive (Barth *et al.*, 2005; Guitart *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2001).

Cependant, il existe encore aujourd'hui peu de matériel disponible permettant de mener des études chez le toupaye. Par ailleurs, le toupaye étant un animal sauvage, la diversité génétique de ces derniers restent une limite aux études en laboratoire.

c- Rongeurs

i) Souris transgéniques exprimant des protéines virales

Afin d'étudier l'effet des protéines virales sur différents aspects cellulaires et immunitaires, des souris exprimant des protéines virales seules ou en combinaisons ont

été générées (pour revue Billerbeck *et al.*, 2013). Ces modèles ont par exemple permis de mettre en évidence l'implication de core dans certaines pathologies du foie tels que les CHCs (Moriya *et al.*, 1997; 1998), mais aussi le possible rôle de NS5A dans l'inhibition de la sécrétion d'IFN- γ , une molécule clé dans la réponse innée et adaptative à l'infection par le HCV (Kanda *et al.*, 2009).

Cependant, ces modèles, notamment en raison des promoteurs utilisés afin de permettre l'expression des transgènes mais aussi du fait que des copies supplémentaires de ces gènes s'intègrent dans le génome de l'hôte, mènent à une expression non physiologique de ces protéines. Ainsi les effets observés pourraient n'être dûs qu'à une surexpression de ces protéines.

ii) Souris et rats xénotransplantés

Cellules hépatocytaires. Face aux inconvénients que présentent les précédents modèles, il était important de développer un modèle qui soit à la fois facilement accessible et sensible à l'infection. Ainsi, des modèles de souris et de rats humanisés ont vu le jour. Un premier système consistait en une xéno greffe ectopique d'hépatocytes humains au niveau de la capsule rénale ou de l'oreille. Cependant, ce système ne se maintenait que quelques semaines et ne permettait que de faibles niveaux de réplication virale (Ilan *et al.*, 2002).

Le modèle actuellement le plus utilisé est celui des souris SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*), immunodéficientes et génétiquement modifiées par un transgène exprimant un activateur du plasminogène (ou urokinase), une protéase à sérine entraînant la formation de plasmine à partir du plasminogène, sous contrôle du promoteur de l'albumine (Alb-uPA). La plasmine étant une peptidase, celle-ci entraîne la fibrinolyse des tissus environnants. Ce gène, sous contrôle d'un promoteur albumine, protéine exprimée dans le foie, entraîne alors la mort des cellules hépatiques. Une xéno greffe avec des hépatocytes humains permet de reconstituer un foie à partir de cellules humaines dans la souris et celle-ci devient alors susceptible à l'infection par le HCV (Mercer *et al.*, 2001). Ces souris chimériques permettent d'établir une infection persistante et se sont révélées particulièrement intéressantes dans l'étude des traitements contre le HCV et de leurs effets sur la propagation virale (Kamiya *et al.*, 2010; Kneteman *et al.*, 2009; Ohara *et al.*, 2011), ainsi que pour l'étude *in vivo* des

anticorps neutralisants ou dirigés contre des facteurs d'entrée du HCV (Lacek *et al.*, 2012; Meuleman *et al.*, 2012; Vanwolleghem *et al.*, 2008). Cependant, ce modèle présente l'inconvénient de ne pas permettre d'étudier la pathogenèse virale, les souris étant immunodéficientes. De plus les souris homozygotes pour le gène Alb-uPA étant stériles, cela rend plus difficile leur élevage.

C'est pour cette dernière raison que des modèles similaires ont été développés, permettant malgré tout la reproduction des animaux homozygotes. Ainsi, des souris knockout ont été générées, déficientes en hydrolase fumaryl-acétoacétate (FAH), une enzyme qui empêche l'accumulation de métabolites du catabolisme de la tyrosine, toxiques pour les cellules du foie (Grompe *et al.*, 1993). L'utilisation de 2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC) permet de bloquer une étape en amont de ce métabolisme et ainsi d'empêcher la production de ces métabolites. L'utilisation de cette drogue permet alors non seulement de contrôler le moment où l'animal sera transplanté, mais également de maintenir la fertilité des animaux, facilitant donc leur élevage (Bissig *et al.*, 2007). De plus, les souris ainsi générées sont bien sensibles à l'infection par le HCV (Bissig *et al.*, 2010).

Un modèle alternatif aux précédents, permettant de travailler sur des animaux immunocompétents, a été développé chez le rat. Des fœtus de rats sont rendus tolérants aux cellules Huh-7 via des injections intra-utérines, puis se voient implanter un grand nombre de ces cellules après la naissance. Si les rats ainsi modifiés sont sensibles à l'infection, le modèle reste pour le moment trop complexe pour en généraliser l'utilisation (Ouyang *et al.*, 2001).

Cellules du système immunitaire. Des souris SCID peuvent, de façon similaire, recevoir des xéno greffes de cellules souches hématopoïétiques (HSC) ou de thymus humain, ce qui permet la production par ces souris de lymphocytes T et B, de cellules NK, ainsi que de cellules myéloïdes d'origine humaine (Ishikawa, 2005). Ainsi, des souris peuvent être transplantées par des hépatocytes et des HSCs humains provenant du même donneur, en faisant des modèles d'autant plus intéressants (**Figure 14**). De plus, ces souris peuvent être infectées efficacement par le HCV et développer une réponse aux lymphocytes T spécifiques (Washburn *et al.*, 2011). Cependant, la pertinence de ce modèle n'est pas encore complètement caractérisée. De plus, ce modèle permet

uniquement l'étude de la phase aiguë de l'infection, le maintien sur le long terme des cellules immunitaires humaines n'étant pas encore au point.

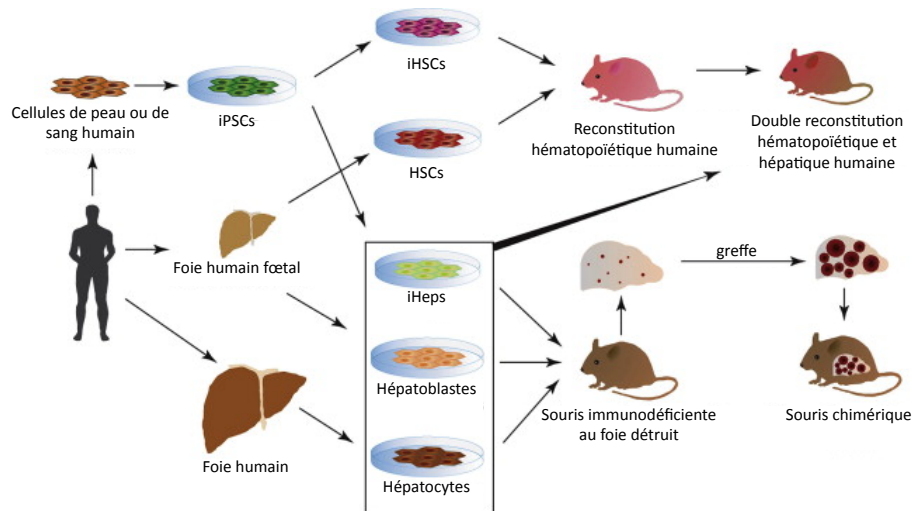


Figure 14 : Génération de souris humanisées par xénogreffes.

Les méthodes de génération de souris possédant un foie humain, des cellules hématopoïétiques humaines, ou les deux, sont présentées. iPSC : cellules souches pluripotentes induites, HSCs : cellules souches hématopoïétiques, iHSCs : cellules souches hématopoïétiques issues de la différenciation d'iPSCs, iHeps : cellules souches hépatiques issues de la différenciation d'iPSCs. (D'après Von Schaeuwen & Ploss, 2014).

iii) Souris génétiquement humanisées

Face aux limites des modèles précédents, un modèle de souris humanisées génétiquement a été développé. Ainsi, l'inoculation de souris avec des adénovirus recombinants exprimant hCD81 et hOCLN, deux protéines jouant un rôle important dans la barrière d'espèce du HCV, est suffisante pour permettre au virus de pénétrer dans les hépatocytes murins *in vivo* (Dorner *et al.*, 2011). Un second modèle, basé sur des souris transgéniques, et permettant une expression stable de hCD81 et hOCLN a été généré. Malheureusement, ce système ne permet qu'une faible infection par le HCV, et ce lorsque la voie de la réponse IFN est bloquée (Dorner *et al.*, 2013).

III- LE CYCLE DE REPLICATION DU HCV

Le cycle de réplication du HCV débute avec l'attachement de la particule virale à des facteurs d'attachement non spécifiques à la surface des cellules cibles. Ceci permet à la particule d'interagir avec ses facteurs d'entrée spécifiques, ce qui aboutit à l'internalisation de la particule virale par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine. L'enveloppe virale fusionne alors avec la membrane d'un endosome précoce, permettant le relargage de la nucléocapside dans le cytoplasme. Après décapsidation, l'ARN(+) est traduit en une polyprotéine qui est clivée et maturée. Les différentes protéines virales permettent alors la réplication de l'ARN génomique du HCV et l'assemblage de la particule virale en association avec les GLs. Les virions néoformés sont sécrétés en suivant la voie de sécrétion des VLDLs (**Figure 15**).

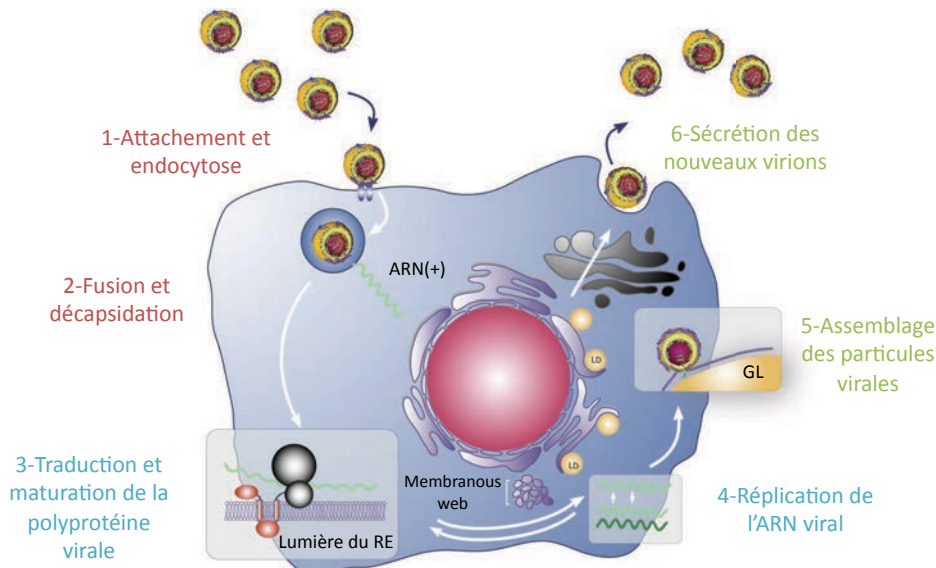


Figure 15 : Cycle de réplication du HCV.

1) Le virus entre en contact avec la cellule cible via des facteurs d'attachement puis, un jeu d'interactions avec des facteurs spécifiques entraîne l'internalisation de la particule virale par endocytose. **2)** L'enveloppe virale fusionne avec la membrane d'un endosome, libérant l'ARN(+) viral dans le cytoplasme. **3)** L'ARN(+) est traduit en une polyprotéine qui est ensuite maturée et clivée. **4)** Les protéines non structurales appartenant à la réplicase virale permettent la réplication de l'ARN viral. **5)** Les protéines structurales et l'ARN(+) néo-synthétisé sont assemblés en association avec les GLs. **6)** Les virions néoformés sont sécrétés en suivant la voie de sécrétion des VLDLs (D'après Popescu & Dubuisson, 2009).

A- Entrée

L'entrée du HCV dans ses cellules cibles est une étape complexe, multiséquentielle, faisant intervenir de nombreux facteurs cellulaires et viraux. L'entrée débute par l'attachement de la particule virale à des facteurs cellulaires non spécifiques tels que les glycosaminoglycanes (GAGs) ou le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDL-R). Cette étape d'attachement permet aux glycoprotéines d'enveloppe, en particulier E2, d'interagir avec certains facteurs d'entrée spécifiques : la tétraspanine CD81 et SR-BI notamment. D'autres facteurs d'entrée interviennent par la suite, en particulier les protéines de jonctions serrées (TJs) claudine-1 (CLDN-1) et occludine (OCLN) ainsi que les récepteurs tyrosine kinases Ephrine A2 (EphA2) et le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGF-R). Le rôle des différents facteurs et l'enchaînement précis des différentes étapes de l'entrée sont encore méconnus. Les interactions avec ces différents récepteurs aboutissent à l'internalisation de la particule virale via une voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Enfin, à pH acide, la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane d'un endosome précoce peut avoir lieu, ce qui permet de libérer l'ARN génomique viral dans le cytoplasme de la cellule cible (**Figure 16**).

Outre cette voie d'entrée, le HCV peut aussi se transmettre directement d'une cellule à une autre. Cette voie d'entrée est encore aujourd'hui très peu caractérisée, bien qu'elle semble partager quelques caractéristiques avec la voie précédemment décrite et nécessitant que des particules virales soient sécrétées dans le milieu extracellulaire. Il semblerait cependant que ce soit la voie majoritaire par laquelle le virus infecte de nouvelles cellules. C'est en effet un moyen d'échapper efficacement aux anticorps neutralisants.

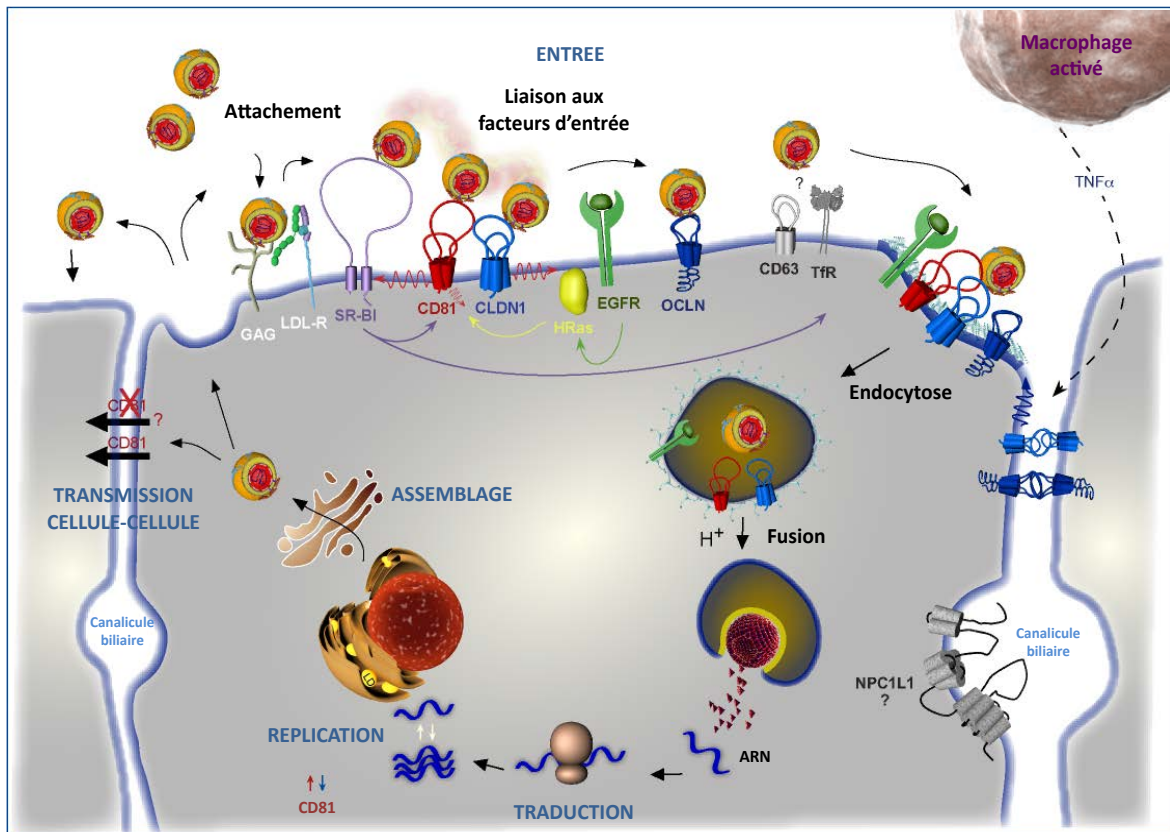


Figure 16 : Entrée du HCV.

La particule virale interagit avec des facteurs d'attachement (GAGs et LDL-R), permettant la liaison subséquente entre les glycoprotéines d'enveloppe et des facteurs d'entrée spécifiques tels que SR-BI et CD81. SR-BI a un rôle précoce dans l'entrée, favorisant l'interaction entre la particule virale et CD81. CD81 forme des complexes avec CLDN1, essentiels pour l'entrée du virus. La formation de ces complexes est favorisée par l'activité tyrosine kinase de EGFR via la GTPase HRas. La particule virale interagit ensuite avec d'autres récepteurs, notamment OCLN et potentiellement le récepteur à la transferrine (TfR). La formation d'un complexe entre la particule virale et l'ensemble de ces facteurs d'entrée du HCV pourrait permettre l'internalisation de la particule virale, par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Le récepteur NPC1L1 participerait quant à lui à l'étape de fusion de part son rôle de transporteur de cholestérol, libérant l'ARN viral dans le cytoplasme. La diffusion membranaire de CD81 régule également l'entrée virale (flèches rouges) Cette diffusion membranaire est favorisée par la sécrétion de TNF- α par les macrophages, cette dernière permettant également la relocalisation d'OCLN des TJs vers les membranes basolatérales. Après la réplication de l'ARN viral et l'assemblage des néo-virions, ces derniers sont soit sécrétés pour infecter de nouvelles cellules, soit transmis directement d'une cellule à une autre par un mécanisme encore à définir (D'après Fénéant *et al.*, 2014).

1- Les facteurs d'attachement

a- Les lectines

Les lectines sont des protéines ayant la capacité de reconnaître des motifs formés par des glycosylations. Elles peuvent donc reconnaître des glycoprotéines. A ce titre, certaines lectines font partie des récepteurs capables de reconnaître des pathogènes et jouent un rôle clé dans l'immunité. Au sein de la superfamille des lectines, on distingue la famille des lectines de type C. Ces lectines sont des protéines transmembranaires de type II caractérisées par la présence d'un ou plusieurs motifs de reconnaissance des carbohydrates (CRD) dépendants du calcium et d'une région de répétition heptades, indispensable à la formation de trimères de ces protéines (pour revue Figdor *et al.*, 2002; Koppel *et al.*, 2005). Parmi les lectines de type C, on trouve les DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) exprimées à la surface de cellules myéloïdes et en particulier des DCs (Geijtenbeek *et al.*, 2000) et les L-SIGN (*Liver/Lymph node-Specific Intercellular adhesion molecules-3 Grabbing Non-integrin*) exprimées essentiellement au niveau des cellules endothéliales sinusoides du foie (Bashirova *et al.*, 2001). Ces lectines en revanche ne sont pas exprimées au niveau des hépatocytes.

Il a été montré que des particules de HCV provenant de séra de patients infectés pouvaient se lier aux DC-SIGN et L-SIGN (Gardner *et al.*, 2003). Des études complémentaires utilisant des formes solubles de E2 ou des VLPs ont permis d'établir que cette liaison se faisait par l'intermédiaire de la glycoprotéine E2 (Gardner *et al.*, 2003; Lozach *et al.*, 2003; Ludwig *et al.*, 2004; Pöhlmann *et al.*, 2003), ce qui a été par la suite confirmé en utilisant des HCVpp et des HCVcc (Chen *et al.*, 2014; Lozach *et al.*, 2003; Stamataki *et al.*, 2009).

Ces deux protéines n'étant pas exprimées au niveau des hépatocytes, le rôle de cette liaison sur l'entrée est indirect. Il a ainsi été montré, en utilisant des HCVpp, que des DCs ayant capturé ces derniers étaient capables de trans-infecter des cellules Huh-7 (Cormier *et al.*, 2004). Des résultats similaires ont été mis évidence avec des lymphocytes B. Ces derniers expriment en effet à la fois L-SIGN et DC-SIGN et peuvent capturer des HCVcc. Les complexes lymphocytes B/HCVcc sont également capables de trans-infecter des cellules Huh-7 (Stamataki *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent donc

que les lectines, exprimées par des cellules endothéliales du foie ou par des DCs, particulièrement présentes au niveau du foie, permettent de recruter les particules virales au niveau de cet organe.

b- Les GAGs

Les GAGs sont la partie osidique des protéoglycanes. Ce sont des chaînes polyosidiques, majoritairement sulfatées, chargées négativement et formées d'une succession de diholosides constitués d'un hexosamine et d'un autre ose tel que l'acide glucuronique. Les GAGs sont des composants des matrices extracellulaires et servent de molécules d'attachement pour de nombreux virus. C'est ainsi le cas du virus de la dengue, un autre membre de la famille des *Flaviviridae* (Chen *et al.*, 1997; Okamoto *et al.*, 2012).

Il a ainsi été montré que des héparanes sulfates, majoritairement présents au niveau du foie, sont impliqués dans l'attachement des particules virales du HCV. En effet, des études ont montré que la glycoprotéine E2 était capable de lier les héparanes sulfates (Barth *et al.*, 2003; Basu *et al.*, 2004; Germi *et al.*, 2002). Ces résultats ont été confirmés en utilisant des HCVcc (Morikawa *et al.*, 2007). De plus, l'incubation de virus issus de patients infectés ou de HCVcc avec de l'héparine, un analogue des héparanes sulfates, ainsi que l'utilisation d'héparinase, inhibent l'infectiosité des particules (Germi *et al.*, 2002; Morikawa *et al.*, 2007). Des études de cinétique ont permis de montrer que les héparanes sulfates intervenaient très précocement au cours de l'entrée virale et donc lors de l'étape d'attachement (Koutsoudakis *et al.*, 2006; Zeisel *et al.*, 2007). Récemment, des héparanes sulfates impliqués dans l'attachement de la particule virale ont été identifiés, il s'agit de syndecan-1 (Shi *et al.*, 2013) et de syndecan-4 (Lefèvre *et al.*, 2014).

Pendant longtemps il était admis que l'attachement de la particule virale via les GAGs se faisait par l'intermédiaire des glycoprotéines d'enveloppe, et en particulier de E2 (Barth *et al.*, 2003). Cependant, aujourd'hui il semble plus probable que cette interaction se fasse par l'intermédiaire des apolipoprotéines incorporées par la particule virale, et plus particulièrement ApoE (Jiang *et al.*, 2013; Lefèvre *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015). De manière intéressante, cette hypothèse est renforcée par le fait que les hétérodimères E1E2 à la surface des HCVpp sont incapables de se lier aux héparanes sulfates (Callens *et al.*, 2005), suggérant que dans le contexte de la particule virale

infectieuse, les sites de liaison aux GAGs sur E2 ne sont pas accessibles et que cette liaison nécessite donc d'autres déterminants à la surface de la particule virale. De plus, le traitement des particules virales avec une lipoprotéine lipase inhibe l'entrée virale en affectant la liaison aux héparanes sulfates (Andréo *et al.*, 2007).

c- LDL-R

Le LDL-R est une glycoprotéine membranaire possédant notamment un module de liaison aux lipoprotéines en N-terminal, un domaine proche du précurseur de l'EGF suivi d'un motif YWTD qui seraient responsables du relargage des lipoprotéines à pH faible, un domaine riche en sérine et thréonine permettant des O-glycosylations et un motif d'endocytose YxxL (pour revue Beglova & Blacklow, 2005). Le LDL-R permet notamment la liaison aux lipoprotéines riches en cholestérol et leur internalisation subséquente. C'est ainsi une protéine clé du métabolisme lipidique et essentielle au maintien de l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme (pour revue Go & Mani, 2012). De manière intéressante, le LDL-R est capable d'interagir avec ApoB et ApoE, deux constituants des particules virales.

Il a ainsi été montré que le LDL-R est un facteur d'attachement du HCV (Agnello *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2008; Monazahian *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 2009; Wünschmann *et al.*, 2000). L'utilisation d'anticorps dirigés contre le LDL-R ainsi que l'incubation du virus avec des LDLs inhibent l'entrée du virus (Agnello *et al.*, 1999; Germei *et al.*, 2002). De plus, le silencing du LDL-R inhibe l'entrée du HCV (Albecka *et al.*, 2012). Le rôle du LDL-R dans l'entrée virale est renforcé par le fait que la particule virale incorpore des apolipoprotéines, en particulier ApoB et ApoE. Des anticorps dirigés contre ApoB ou ApoE, ainsi que des anticorps dirigés contre les VLDLs et les LDLs inhibent l'entrée du HCV (Andréo *et al.*, 2007). De plus, les HCVpp, qui ne sont pas associées à des lipoprotéines, ne dépendent pas du LDL-R pour leur entrée, ce qui va dans le sens d'une liaison au LDL-R via les apolipoprotéines incorporées dans la particule virale (Bartosch *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003; Sandrin *et al.*, 2005). De plus, la délétion de la région HVR1 de E2 diminue la dépendance des HCVcc au LDL-R, or cette région est associée à l'incorporation des apolipoprotéines dans les particules virales (Prentoe *et al.*, 2014).

Cependant, des études plus récentes ont suggéré que l'association de la particule virale avec le LDL-R menait à une infection non productive et que le LDL-R aurait un rôle à une étape plus tardive du cycle (Albecka *et al.*, 2012). De plus, l'utilisation d'une

lipoprotéine lipase, augmente l'attachement à la surface des cellules indépendamment des GAGs mais inhibe l'infection. Ceci pourrait suggérer que l'utilisation de cette enzyme favoriserait l'attachement de la particule virale au LDL-R, induisant son endocytose suivant une voie non productive (Andréo *et al.*, 2007). Dans le même sens, une étude ayant réalisé le silencing de LDL-R a montré que l'attachement de la particule virale à la surface des cellules n'était pas affecté mais que l'infection était malgré tout inhibée (Jiang *et al.*, 2012). De manière intéressante, une étude a montré que l'infection par le HCV augmentait l'expression du LDL-R, augmentant la prise de lipides par la cellule infectée. Il est donc possible que le LDL-R, en favorisant la prise de lipides par la cellule, soit important pour l'assemblage et la sécrétion de particules virales (Syed *et al.*, 2014).

2- Les facteurs d'entrée spécifiques

a- CD81

L'implication de CD81 dans l'entrée du HCV a été décrite en détails dans Fénéant *et al.*, 2014 (Annexe 1).

b- SR-BI

SR-BI est une protéine membranaire possédant deux domaines transmembranaires. C'est une protéine hautement N-glycosylée et palmitoylée, possédant une large boucle extracellulaire et deux courts segments N- et C-terminaux intracellulaires (**Figure 17**). SR-BI joue essentiellement un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines en permettant le transfert des esters de cholestérol présents dans les HDLs (*High Density Lipoproteins*), entraînant un enrichissement de la membrane plasmique en cholestérol. SR-BI possède cependant une grande variété de ligands naturels tels que les LDLs oxydés et acétylés ou encore les VLDLs. C'est une protéine majoritairement exprimée dans les tissus stéroïdogènes ainsi qu'au niveau du foie (pour revue Shen *et al.*, 2014).

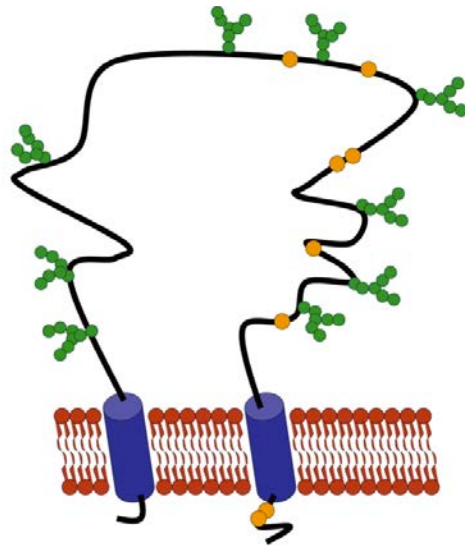


Figure 17 : Représentation schématique de SR-BI.

SR-BI est constitué de deux domaines transmembranaires, d'une large boucle extracellulaire et de deux courts domaines intracellulaires. Les N-glycosylations sont indiquées en vert et les sites de palmitoylation sont indiqués en jaune (Hoekstra *et al.*, 2010).

Contrairement au LDL-R et bien qu'ayant physiologiquement des fonctions similaires, SR-BI a un rôle actif dans l'infection par le HCV. Des études ont ainsi montré que SR-BI était un facteur d'entrée du HCV (Scarselli *et al.*, 2002). L'importance de SR-BI dans l'entrée virale a été prouvée à de nombreuses reprises en inhibant l'infection des HCVpp et des HCVcc, à la fois *in vitro* et *in vivo*, aussi bien en utilisant des anticorps dirigés contre SR-BI qu'en réalisant un silencing de ce dernier (Bartosch *et al.*, 2003; Catanese *et al.*, 2007; 2010; Dreux *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2012; Kapadia *et al.*, 2007; Lacek *et al.*, 2012; Lavillette *et al.*, 2005; Meuleman *et al.*, 2012; Vercauteren *et al.*, 2014; Zeisel *et al.*, 2007). A l'inverse, la surexpression de SR-B1 semble augmenter l'infection par le HCV (Grove *et al.*, 2007).

SR-BI joue plusieurs rôles dans l'entrée du virus, aussi bien dans l'attachement de la particule virale qu'à des étapes post-attachement. Une étude a disséqué les différentes fonctions de SR-BI dans l'infection virale et en a décrites trois distinctes (Thi *et al.*, 2012).

Tout d'abord, SR-BI joue un rôle dans l'attachement de la particule virale à la surface des hépatocytes. Il a en effet été montré que des cellules CHO exprimant SR-BI étaient capables de lier les particules virales, alors que des cellules CHO exprimant seulement CD81 en étaient incapables (Maillard *et al.*, 2006). De façon similaire au LDL-

R, cette étape est dépendante de l'interaction entre SR-BI et les apolipoprotéines de la particule virale, notamment ApoB (Maillard *et al.*, 2006; Thi *et al.*, 2012).

Ensuite, des expériences de cinétique ont montré que SR-BI exerçait une autre fonction à une étape plus tardive, concomitante avec celle de CD81 et permettant l'entrée de la particule virale (Haberstroh *et al.*, 2008; Thi *et al.*, 2012; Zeisel *et al.*, 2007). Il a alors été suggéré qu'un complexe pouvait se former entre la particule virale et différents facteurs d'entrée, dont CD81 et SR-BI (Harris *et al.*, 2008; Krieger *et al.*, 2010; Zeisel *et al.*, 2007). Il a été proposé que SR-BI, de part sa capacité à transférer des lipides, était capable de modifier la composition lipoprotéique du virion ou la composition de la membrane plasmique pendant l'étape d'entrée et que ces changements facilitaient les interactions entre la particule virale et les autres facteurs d'entrée spécifiques. De manière intéressante, un traitement avec des HDLs promeut l'entrée du HCV quand la fonction de transfert lipidique de SR-BI est fonctionnelle et dépendante de ApoC1 (Bartosch *et al.*, 2005; Meunier *et al.*, 2005; Voisset *et al.*, 2005). En revanche, les LDLs oxydés ont un effet inhibiteur (Hahn *et al.*, 2006). De plus, une étude récente a montré que cette étape dépendait directement du transfert de lipides et non de la liaison aux HDLs en elle-même. En effet, l'utilisation d'anticorps bloquant la fonction de transfert lipidique de SR-BI sans empêcher l'interaction entre SR-BI et les HDLs, inhibe l'infection (Zahid *et al.*, 2013).

Enfin, une dernière fonction a été décrite pour ce récepteur, qui serait une fonction de facilitation de l'entrée de la particule. Cette étape, quant à elle, est dépendante de l'interaction avec E2. SR-BI est en effet capable d'interagir avec la glycoprotéine E2 et la région HVR1 de cette dernière semble permettre cette interaction (Scarselli *et al.*, 2002). Ainsi, les fonctions de SR-BI médiées par sa liaison à E2 et avec les apolipoprotéines de la particule sont différentes. Ceci est en accord avec le fait que lorsque la région HVR1 de E2, essentielle à l'interaction avec SR-BI, est délétée, l'infection par le HCV est réduite sans être abolie (Bankwitz *et al.*, 2010; Prentoe *et al.*, 2011). Ceci suggère également que l'interaction de SR-BI avec E2 pourrait rendre accessible le site de liaison E2-CD81, induisant un changement de conformation qui ne serait plus nécessaire dans le cadre d'une protéine E2 délétée de HVR1. Egalement, l'utilisation d'un orthologue murin de SR-BI, incapable de se lier à E2, est malgré tout capable de permettre l'entrée du HCV (Barth *et al.*, 2005; Catanese *et al.*, 2010).

c- Protéines de jonctions serrées

i) Les jonctions serrées

Les hépatocytes sont des cellules polarisées. Ces cellules épithéliales permettent les échanges entre les canalicules biliaires et le sang sinusoïdal et cette fonction est assurée par leur polarisation, permise entre autres par la formation de TJs. En effet, ces dernières permettent de séparer les deux milieux en permettant le passage sélectif de solutés, et particulièrement d'ions, étant négativement chargées. Contrairement à de nombreuses cellules épithéliales, les hépatocytes sont organisés de manière multipolaire. En effet, chaque hépatocyte participe à la formation de plusieurs canalicules biliaires. Ainsi le pôle apical des hépatocytes, en contact avec les canalicules biliaires représente environ 10% de la surface des hépatocytes, la majeure partie de la surface des hépatocytes étant en contact avec le sang sinusoïdal (**Figure 18**).

Les TJs sont constituées notamment par des protéines possédant quatre domaines transmembranaires telles que les CLDNs et OCLN mais aussi la tricelluline, dont les domaines extracellulaires interagissent entre eux entre deux cellules adjacentes, permettant le rapprochement des membranes plasmiques. Les TJs possèdent aussi des protéines ayant un seul domaine transmembranaire, comme les molécules d'adhésion cellulaire ou les récepteurs aux virus coxsackie et aux virus adéno-associés. Ces protéines membranaires interagissent avec des protéines intracellulaires, notamment les protéines de la famille *Zona Occludens* (ZO), ZO-1, -2 et 3. Ces protéines permettent de faire le lien entre les protéines membranaires et les protéines du cytosquelette, en particulier les molécules d'actine, grâce à de nombreux sites de liaison aux protéines membranaires et du cytosquelette (pour revue (Boyer, 2014)) (**Figure 18**). De manière intéressante, les TJs sont utilisées par certains virus pour pénétrer dans leurs cellules cibles. C'est ainsi le cas des virus coxsackie du groupe B (CBVs). En effet, l'attachement du virus à certains de ces récepteurs entraîne une réorganisation de l'actine, permettant la migration du virus au niveau des TJs (Coyne & Bergelson, 2005).

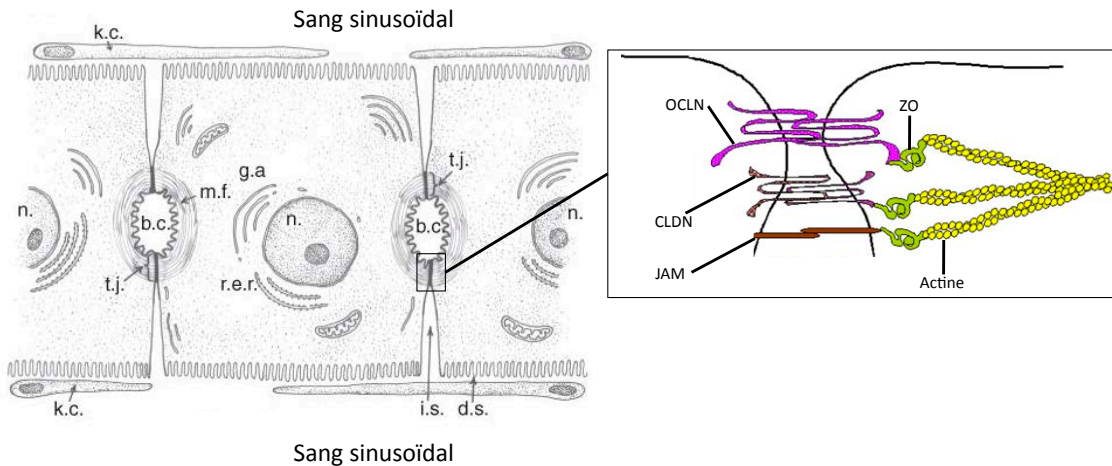


Figure 18 : Polarisation des hépatocytes.

Les hépatocytes adjacents sont liés entre eux par des TJs en contact avec de nombreux éléments du cytosquelette, délimitant la membrane basolatérale en contact avec le sang sinusoïdal et la membrane apicale en contact avec la bile dans les canalicules biliaires. Un zoom sur les TJs permet d'en voir la composition. Les domaines extracellulaires de OCLN, des CLDNs et des molécules d'adhésion cellulaire (JAM) permettent de rapprocher les membranes plasmiques des cellules adjacentes. Ces protéines sont en lien avec le cytosquelette par l'intermédiaire des protéines adaptatrices ZO. n : noyau, b.c : canalicule biliaire, t.j : jonction serrée, k.c : cellule de Küpffer, r.e.r : reticulum endoplasmique rugueux, g.a : appareil de golgi, m.f : microfilaments et autres éléments du cytosquelette, d.s : espace de Disse, i.s : espace intercellulaire (D'après Boyer, 2013; Mehta, 2006).

ii) Claudine-1, -6 et -9

CLDN-1 est une protéine possédant quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires (ECL1 et ECL2) et trois régions intracellulaires (**Figure 19**). C'est une protéine particulièrement exprimée au niveau du foie et présente au niveau des TJs (Yang *et al.*, 2008a).

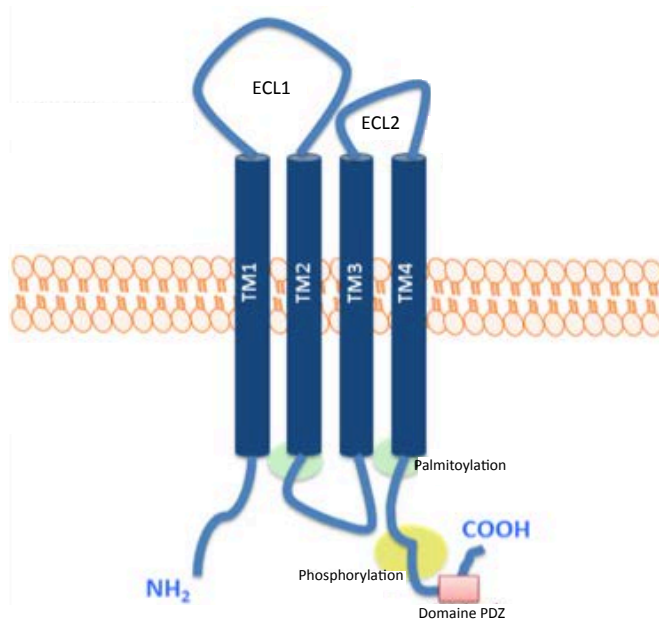


Figure 19 : Représentation schématique de CLDN-1, -6 et -9.

Les CLDN-1, 6 et -9 sont constituées de quatre domaines transmembranaires (TM), de deux boucles extracellulaires (ECL1 et ECL2) et de trois domaines cytoplasmiques. Un domaine PDZ en C-terminal permet la liaison aux protéines ZO au sein des TJs. (D'après English & Santin, 2013)

CLDN-1 a été identifiée comme étant un facteur d'entrée du HCV (Evans *et al.*, 2007). Ainsi, le silencing de CLDN-1 (Yang *et al.*, 2008a) ainsi que l'utilisation d'anticorps dirigés contre cette protéine (Fofana *et al.*, 2010; Krieger *et al.*, 2010) inhibent l'infection par le HCV. De manière intéressante, les cellules déficientes pour l'expression de Diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT1), qui entraîne une diminution de l'expression de CLDN-1, ne sont pas permissives aux HCVpp (Sung *et al.*, 2014).

Des expériences de cinétique ont montré que CLDN-1 intervient dans l'entrée du HCV de façon concomitante ou légèrement après CD81 (Krieger *et al.*, 2010). Le domaine ECL1 de CLDN-1 semble particulièrement important pour l'entrée virale (Cukierman *et al.*, 2009; Douam *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2007; Meertens *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008a; Zheng *et al.*, 2007). Ainsi, CLDN-1 forme des complexes avec CD81 et cette interaction est essentielle à l'entrée du virus (Davis *et al.*, 2012; Harris *et al.*, 2008; Mee *et al.*, 2009). La mutation des résidus 32 et 48 dans ECL1 abolit l'interaction avec CD81 et l'infection par le HCV, appuyant l'importance de ECL1 dans l'interaction avec CD81 et l'importance de cette interaction pour l'entrée virale (Harris *et al.*, 2010). De plus, le remplacement des résidus correspondants dans CLDN-7 par ceux de CLDN-1 rend cette protéine capable de médier l'infection par le HCV. Par ailleurs, les résidus 159, 142 et 143 dans la

LEL de CD81 ont été impliqués dans l'interaction avec CLDN-1 (Davis *et al.*, 2012). De plus, des anticorps dirigés contre CLDN-1 qui neutralisent efficacement l'infection abolissent également cette interaction (Krieger *et al.*, 2010). Si aucune interaction entre CLDN-1 et sE2 n'a pu être identifiée (Evans *et al.*, 2007; Krieger *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2007), il semblerait en revanche que la particule virale puisse interagir avec ECL1 de CLDN-1 par l'intermédiaire du complexe E1E2, suggérant des changements de conformation induits par la formation des oligomères de E1 et E2 (Douam *et al.*, 2014).

De manière intéressante, il a été montré que l'interaction entre CD81 et CLDN-1 favorisait leur co-endocytose. En effet, contrairement à la plupart des tétraspanines, CD81 ne possède pas de motif d'endocytose à son extrémité C-terminale (Bonifacino & Dell'Angelica, 1999; Haucke & Krauss, 2002). En revanche, CLDN-1 est facilement internalisée par endocytose (Utech *et al.*, 2010; Yu & Turner, 2008). Ainsi, CLDN-1 pourrait favoriser la co-internalisation des deux récepteurs, la liaison avec la particule virale pouvant servir de stimulus à cette endocytose (Farquhar *et al.*, 2012).

Bien que CLDN-1 soit une protéine de TJs, elle est également présente en dehors de ces jonctions. Les premières études tendaient à prouver que c'était le pool de CLDN-1 associé aux TJs qui était important pour l'infection par le HCV. En effet, la liaison de E2 à CD81 induit une voie de signalisation via la GTPase Rho, ayant pour conséquence un réarrangement de l'actine. Un tel réarrangement pouvait permettre la migration de la particule virale de la membrane basolatérale aux TJs, permettant l'association avec CLDN-1 (Brazzoli *et al.*, 2008). Ceci était renforcé par le fait que des études avaient montré que la présence de CLDN-1 au niveau des TJs corrélait avec la permissivité au HCV (Liu *et al.*, 2009a; Yang *et al.*, 2008a). Cependant, les études plus récentes vont en faveur de l'utilisation du pool de CLDN-1 se trouvant en dehors des TJs, au niveau des membranes basolatérales. En effet, il a été montré que les facteurs d'entrée du HCV étaient essentiellement présents au niveau des membranes basolatérales des hépatocytes, même chez des patients infectés (Reynolds *et al.*, 2008). De plus, les complexes entre CD81 et CLDN-1 peuvent se former en dehors des TJs et leur fréquence d'association n'est pas modifiée par l'infection (Harris, 2008). De plus, la délétion de la partie C-terminale de CLDN-1, impliquée dans le recrutement aux TJs, n'inhibe pas l'entrée du virus (Evans *et al.*, 2007). Egalement, la déplétion en Ca²⁺ de cellules HepG2, qui permet de désorganiser les TJs et de dépolariser les cellules, augmente l'infection (Mee *et al.*, 2008; 2009). Des expériences de microscopie sur cellules vivantes ont

également montré que le virus ne migrerait pas au niveau des jonctions cellule-cellule lors de l'infection (Coller *et al.*, 2009).

Par ailleurs, d'autres membres de la famille des CLDNs pourraient avoir un rôle dans l'entrée virale. Ainsi, des expériences menées sur des cellules HEK-293T, naturellement non permissives au HCVpp, ont montré que l'expression de CLDN-1, -6 ou -9 les rend permissives alors que l'expression de CLDN-7 ne permet pas l'entrée virale (Meertens *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007). De manière intéressante, l'utilisation des différentes CLDNs par le HCV dépend du génotype viral. Ainsi les isolats J6 et JFHs, de génotype 2a semblent utiliser moins efficacement CLDN-6 (Haid *et al.*, 2014). Aussi, l'implication exacte de CLDN-6 et -9 reste controversée. En effet, elles ne sont pas exprimées dans les lignées cellulaires permissives au HCV (Meertens *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007). Il se pourrait que ces protéines aient un rôle dans des cellules autres que les hépatocytes. En effet, il a été montré que le HCV pouvait infecter des cellules du système nerveux central (Forton *et al.*, 2004a, b; Wilkinson *et al.*, 2009). Des données indiquent également que des cellules du système immunitaire, notamment des lymphocytes T et B, pourraient supporter la réplication virale, bien que ces résultats restent controversés (Ducoulombier *et al.*, 2004; MacParland *et al.*, 2006; Sarhan *et al.*, 2012). De manière intéressante, CLDN-6 est exprimée au niveau des lymphocytes T permissifs au HCV et pourrait donc naturellement jouer un rôle dans ces cellules plutôt que dans les hépatocytes (Sarhan *et al.*, 2013).

iii) Occludine

OCN est une autre protéine des TJs. Elle possède quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires (ECL1 et ECL2) et trois domaines intracellulaires (**Figure 20**). La découverte de OCN comme facteur d'entrée a été possible grâce à l'établissement d'une banque d'ADNc à partir de cellules Huh-7.5. Les ADNc obtenus ont été transfectés dans des cellules murine NIH-3T3 exprimant CD81, SR-BI et CLDN-1 humain. L'expression de OCN dans ces cellules les rendait permissives aux HCVpp (Ploss *et al.*, 2009). De plus, le silencing de OCN permet d'inhiber l'infection (Benedicto *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009a).

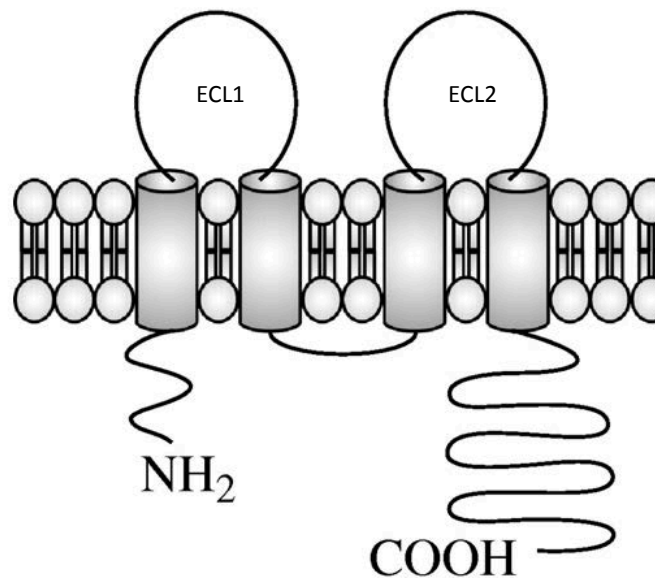


Figure 20 : Représentation schématique de OCLN.

OCLN possède quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires (ECL1 et ECL2) ainsi que trois domaines cytoplasmiques. La queue C-terminale permet l'interaction avec les protéines ZO au sein des TJs (D'après Morrow *et al.*, 2010).

De manière intéressante, la protéine E2 issue de virus co-précipite avec OCLN dans des cellules infectées (Liu *et al.*, 2009a), suggérant une interaction entre les deux protéines. Des observations en microscopie confocale ont également permis de mettre en exergue la colocalisation entre E2 et OCLN (Benedicto *et al.*, 2008). Cependant, la forme soluble sE2 est incapable d'interagir avec OCLN (Liu *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a été montré que le domaine ECL2 de OCLN était essentiel pour l'infection par le HCV alors qu'à l'inverse, le retrait de ECL1 n'affectait pas l'entrée virale. De plus, la mutation de deux résidus dans l'ECL2, identifiés chez la souris, suffit à impacter l'infection par le HCV (Ciesek *et al.*, 2011).

L'étude de la fonction d'OCLN dans l'entrée virale est particulièrement difficile du fait de l'absence d'anticorps dirigés contre cette protéine permettant de neutraliser l'infection. Récemment, des constructions d'OCLN possédant un tag Flag à différents endroits de la protéine ont été générées (Sourisseau *et al.*, 2013). L'utilisation d'anticorps anti-Flag a permis de neutraliser l'infection par des HCVcc et ainsi de réaliser des expériences de cinétique. Ces études ont démontré qu'OCLN intervenait dans l'entrée à une étape plus tardive que CD81, SR-BI et CLDN-1. De plus les auteurs ont montré que les différents génotypes viraux n'utilisent pas OCLN de la même manière. Notamment, les particules de génotypes 1a et 3a étaient inhibées par

l'anticorps anti-Flag, indiquant une interaction directe entre la particule virale et OCLN (Sourisseau *et al.*, 2013). D'autres études avaient suggéré un rôle tardif d'OCLN, notamment en montrant qu'elle n'était pas nécessaire à l'attachement de la particule virale mais que son silencing affectait l'étape de fusion (Benedicto *et al.*, 2009). L'association entre OCLN et la dynamine II, une protéine importante pour l'endocytose et pour l'entrée du HCV, suggère également l'importance d'OCLN à une étape tardive de l'entrée (Liu *et al.*, 2010).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le HCV ne semble pas utiliser les TJs pour pénétrer dans ses cellules cibles. De manière intéressante, une étude a montré que lors d'une infection par le HCV, les macrophages activés sécrètent du TNF- α . Cette sécrétion entraînerait la relocalisation d'OCLN au niveau de la membrane basolatérale ainsi que des modifications des propriétés de diffusion membranaire de CD81, ce qui faciliterait l'entrée du virus (Fletcher *et al.*, 2014).

Avec CD81, OCLN est responsable du tropisme d'espèces du HCV. En effet, une étude a caractérisé les orthologues d'OCLN dans différentes espèces. Ceux des rongeurs ne permettaient pas l'infection par le HCV alors que ceux des primates étudiés rendaient des cellules exprimant très peu d'OCLN, les cellules 786-O, permissives aux HCVpp (Michta *et al.*, 2010). De même, l'étude initiale ayant mené à la découverte d'OCLN comme facteur d'entrée, utilisait des cellules murines, non permissives aux HCVpp (Ploss *et al.*, 2009). L'expression des formes humaines de CD81 et OCLN (hCD81 et hOCLN) dans ces modèles murins suffisait à les rendre permissifs au HCV (Dorner *et al.*, 2011; 2013).

d- Récepteurs tyrosine kinase

Plus récemment, deux récepteurs tyrosine kinase (RTKs), EGF-R et EphA2 ont été décrits comme étant des facteurs d'entrée du HCV (Lupberger *et al.*, 2011).

EGF-R appartient à la famille des récepteurs tyrosine kinase ErbB. Les récepteurs de cette famille sont impliqués dans le développement embryonnaire, la différenciation, la croissance, la migration, l'adhésion cellulaire ou encore l'apoptose. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires constituées d'un domaine extracellulaire peu conservé permettant la fixation de différents ligands, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique possédant une activité tyrosine kinase ainsi que de

nombreux sites d'autophosphorylation. Les récepteurs de cette famille sont activés suite à la fixation d'un ligand tel que l'EGF, le TGF α (*Tumor Growth Factor α*), ou l'amphiréguline dans le cas d'EGF-R. Cette fixation entraîne l'homo- ou l'hétéro-dimérisation des récepteurs permettant ainsi leur autophosphorylation et, en activant de la sorte le domaine catalytique kinase, la transduction du signal induit par la fixation du ligand. Différentes voies de signalisation ont été décrites. Ces grandes voies sont la voie Ras/MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) qui régule la prolifération et la survie cellulaire, la voie PI3K (Phosphoinositide-3 Kinase) ayant un rôle dans la croissance cellulaire, mais aussi la voie des STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), de la kinase Src ou encore de la phospholipase C. Les récepteurs activés sont ensuite internalisés et sont soit dégradés, soit recyclés à la surface cellulaire, stoppant la transduction du signal.

L'EphA2 appartient à la sous-famille des Eph de type A. C'est une protéine kinase possédant un domaine globulaire de liaison au ligand en N-terminal ainsi qu'un domaine de répétition fibronectine de type III. Il possède un domaine à activité kinase dans sa partie cytoplasmique ainsi qu'un motif SAM (*Sterile α -motif*) impliqué dans les interactions protéine-protéine, et un domaine de liaison aux protéines PDZ. Ce récepteur est impliqué dans le développement vasculaire, la migration cellulaire, le guidage axonal, la mise en place des frontières de tissus ou encore la plasticité synaptique. C'est donc une molécule clé du développement. L'activation de ces récepteurs mène notamment à l'inhibition de la voie ERK/MAPK (pour revue Kullander & Klein, 2002).

De manière intéressante, le silencing de ces deux protéines kinases inhibe l'infection par les HCVpp et les HCVcc à une étape tardive, en bloquant les étapes d'endocytose et de fusion. De plus, la liaison de ces récepteurs à leur ligand respectif augmente l'infection, probablement en stimulant leur endocytose. Il a également été montré que l'activité tyrosine kinase de ces récepteurs était importante pour l'entrée puisque des inhibiteurs de RTKs, tel que l'Erlotinib (un inhibiteur de l'EGF-R), inhibent l'infection. Cette étude a également montré que ces récepteurs favorisaient la formation des complexes CD81/CLDN-1, essentiels à l'entrée virale. De plus, l'interaction entre la particule virale et CD81 permet l'activation de ces deux récepteurs, entraînant leur internalisation (Lupberger *et al.*, 2011). Cependant, l'implication de l'activité tyrosine kinase est controversée. En effet, une étude a montré que le fait de bloquer l'activité tyrosine kinase de l'EGF-R et en parallèle l'utilisation de certains anticorps anti-EGF-R

permettait de stimuler l'endocytose de ce récepteur et ainsi de permettre la co-internalisation de la particule virale avec CD81 et CLDN-1 (Diao *et al.*, 2012). De plus une étude n'a pas vu d'effet sur l'infection d'une stimulation par l'EGF (Farquhar *et al.*, 2012). En revanche, d'autres études ont mis en évidence l'importance de certaines voies de signalisation induites par l'EGF-R dans l'entrée virale. C'est le cas de certains effecteurs de la voie MAPK. Il semblerait en effet que l'activation de l'EGF-R active HRas (*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*), une GTPase membranaire qui pourrait par la suite s'associer à CD81. Cette association participerait à la diffusion latérale de CD81 et permettrait son association avec CLDN-1 (Zona *et al.*, 2013). De même, une étude a montré l'importance de la voie PI3K/Akt, une voie induite par l'EGF-R, dans l'entrée du HCV. Cette voie serait induite lors de l'infection et son inhibition affecterait l'entrée virale (Liu *et al.*, 2012).

e- Les nouveaux facteurs d'entrée

Récemment d'autres facteurs ont été décrits comme étant impliqués dans l'entrée virale mais leur rôle reste à définir. C'est ainsi le cas du transporteur de cholestérol Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), une protéine contenant 13 domaines transmembranaires et exprimée essentiellement au niveau de la membrane apicale des hépatocytes et dans les entérocytes. C'est une protéine clé dans l'homéostasie du cholestérol. Le silencing de cette protéine ainsi que l'utilisation d'anticorps dirigés contre celle-ci inhibent l'infection à une étape tardive de l'entrée des HCVcc. Un inhibiteur de ce transporteur, l'Ezetimibe, est également capable d'inhiber l'infection. Par ailleurs, un test de fusion a permis de mettre en évidence que NPC1L1 pourrait avoir un rôle au moment de la fusion ou alors peu de temps avant celle-ci. Enfin, il a été montré que l'activité de NPC1L1 était dépendante du cholestérol associé aux particules virales (Sainz *et al.*, 2012). Il est possible que NPC1L1, en modifiant la composition des membranes en cholestérol à une étape tardive de l'entrée, puisse initier indirectement la fusion. En effet, la fusion des particules virales dépend de la composition en cholestérol des membranes (Lavillette *et al.*, 2006).

Récemment, le récepteur 1 à la transferrine (TfR) a été impliqué dans l'entrée virale. Ce récepteur est exprimé de façon ubiquitaire et permet le transport du fer

depuis le sang vers le milieu intracellulaire. Le silencing et l'utilisation d'anticorps anti-TfR inhibent l'infection des HCVpp et des HCVcc, suggérant un rôle dans l'entrée. Des expériences de cinétique ont montré que TfR pourrait intervenir après la liaison à CD81. La particule virale serait capable d'interagir avec TfR. De manière intéressante, le silencing de la protéine TTP (*TfR Trafficking Protein*), une protéine qui permet l'internalisation de TfR, inhibe également l'entrée, suggérant que TfR pourrait agir à l'étape d'internalisation du virus (Martin & Uprichard, 2013). Cependant, le mécanisme exact est aujourd'hui inconnu.

En plus de CD81, d'autres tétraspanines ont été décrites comme pouvant avoir un rôle dans l'entrée du HCV. Une étude portant sur la recherche de nouveaux facteurs d'entrée par une approche de génomique intégrative, utilisant comme critères les interactions entre protéines virales et humaines, les interactions secondaires entre les protéines interagissant directement avec les protéines virales et d'autres protéines, ainsi que le réseau des interactions protéiques au sein des jonctions serrées et des microdomaines enrichis en tétraspanines (TEMs), a permis d'identifier la tétraspanine CD63 comme un facteur cellulaire additionnel impliqué dans l'entrée du HCV. C'est une protéine principalement exprimée dans les endosomes tardifs/corps multivésiculaires et impliquée dans le transport intracellulaire des protéines (pour revue (Pols & Klumperman, 2009)). Une interaction directe entre E2 et CD63 a été décrite. De plus, le silencing et l'utilisation d'anticorps anti-CD63 inhibent l'infection (Park *et al.*, 2013). Une autre étude, moins convaincante, a mis en évidence un rôle potentiel de CD151 dans l'entrée. CD151 est une protéine principalement présente au niveau des tumeurs, dont les CHC. Elle est notamment impliquée dans des processus d'angiogenèse, de prolifération et de migration cellulaire. CD151 aurait un rôle aussi bien au moment de l'attachement que dans des étapes plus tardives de l'entrée. Le silencing et l'utilisation d'anticorps anti-CD151 montraient une inhibition de l'infection (Zhu *et al.*, 2012). De plus, les auteurs ont montré que sE2 était capable d'interagir avec CD151 (Sanz Cameno *et al.*, 2008). De manière intéressante, une étude a montré qu'une protéine partenaire de CD151, l'intégrine $\beta 1$, pouvait également être impliquée dans l'entrée, puisque le silencing de cette protéine inhibait l'infection par les HCVcc et l'entrée des HCVpp (Zona *et al.*, 2013).

Plus récemment, la protéine CIDEB (*Cell death-Inducing DFFA-like Effector B*) a été impliquée dans l'entrée du HCV. C'est une protéine appartenant à la famille des CIDE, des protéines impliquées dans la dépense énergétique et le métabolisme lipidique (Li & Li, 2007). Ces protéines sont associées aux GLs (Jambunathan *et al.*, 2011) et sont particulièrement exprimées au niveau du foie (Inohara *et al.*, 1998). Il a été montré que le silencing de CIDEB inhibait l'infection par les HCVcc et que cette protéine était essentielle pour une étape tardive de l'entrée virale. Un test de fusion a montré que CIDEB pourrait être impliquée dans cette étape. De plus, le domaine C-terminal de cette protéine semble déterminant pour l'infection (Wu *et al.*, 2014b).

Enfin, un autre récepteur a été identifié comme étant important pour l'entrée du HCV dans certaines cellules du système immunitaire. Il s'agit du récepteur CD5, une protéine appartenant à la famille des récepteurs scavenger riches en cystéines. C'est un récepteur que l'on retrouve à la surface des lymphocytes T et de certaines populations de lymphocytes B mais dont le rôle exact est encore peu caractérisé. Il a été montré que l'utilisation d'anticorps dirigés contre CD5 ou le silencing de cette protéine inhibe la susceptibilité à l'infection de ces cellules. A l'inverse, l'augmentation de l'expression de CD5 augmente l'entrée du virus dans ces cellules. De plus, l'expression de CD5 dans des cellules HEK-293 facilite l'infection (Sarhan *et al.*, 2012).

3- Endocytose

Comme pour de nombreux virus, le HCV est internalisé en suivant une voie d'endocytose dépendante de la clathrine. En effet, il a été montré que le silencing de la clathrine inhibait l'infection par les HCVpp et les HCVcc. De plus, l'utilisation de chlorpromazine, une molécule qui entraîne la redistribution membranaire de AP-2, une protéine adaptatrice de la clathrine, inhibe également l'infection (Blanchard *et al.*, 2006). Une étude plus récente a montré que le silencing d'une autre protéine de cette voie, la dynamine II, inhibe aussi l'infection (Liu *et al.*, 2010). De manière intéressante, et comme nous l'avons vu auparavant, la particule virale semble être internalisée sous forme d'un complexe avec différents facteurs d'entrée, notamment CD81, CLDN-1, OCLN, EGF-R et plus récemment, le TfR (Diao *et al.*, 2012; Farquhar *et al.*, 2012; Harris *et al.*, 2008; Krieger *et al.*, 2010; Martin & Uprichard, 2013). Il a ensuite été montré que la

particule virale était délivrée aux endosomes précoces exprimant Rab5 (Farquhar *et al.*, 2012; Meertens *et al.*, 2006).

De manière intéressante, une étude très récente a décrit une voie d'internalisation alternative à la voie d'endocytose dépendante de la clathrine pour l'entrée du HCV. En effet, l'utilisation de chlorpromazine dans cette étude n'inhibait pas complètement l'infection. Matsuda et collaborateurs ont alors cherché à caractériser cette voie. L'inhibition de l'expression de la clathrine, de la dynamine II ainsi que d'autres protéines intervenant dans d'autres voies connues d'endocytose telles que la caveoline-1, Arf6 (*ADP-ribosylation factor 6*), la flotilline ou encore PAK1 (*p21-activated kinase 1*) n'avait pas d'effet sur l'entrée du virus (Matsuda *et al.*, 2014).

4- Fusion

Une fois au niveau des endosomes précoces, l'enveloppe de la particule virale fusionne avec la membrane des endosomes, ce qui permet de libérer le génome viral encapsidé dans le cytoplasme. Le processus de fusion lors de l'infection HCV est encore très mal compris, mais par analogie avec d'autres virus il est supposé que ce processus se divise en plusieurs étapes. Il y aurait tout d'abord un changement conformationnel des protéines de fusion, puis l'insertion d'un peptide de fusion dans la membrane de la cellule cible et enfin un mélange entre les lipides des deux hémimembranes qui fusionnent, aboutissant à la fusion complète entre les deux membranes. Il a été montré pour le HCV que ce processus était dépendant du pH et qu'un pH compris entre 4 et 6,3 permettait la fusion entre des HCVcc et des liposomes (Haid *et al.*, 2009). De plus, l'utilisation de différentes molécules qui augmentent le pH des endosomes telles que la Bafilomycine A1 (BAF) et la Concanamycine A, qui bloquent les pompes ATPase/H⁺, ou la chloroquine et le NH₄Cl, deux bases faibles qui augmentent le pH des endosomes, inhibent l'entrée du HCV (Bartosch *et al.*, 2003; Blanchard *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2003; Koutsoudakis *et al.*, 2006; Meertens *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2011; Tscherne *et al.*, 2007).

Les déterminants de la fusion dans les glycoprotéines d'enveloppe ont été discutés précédemment (II) C) 2) c) ii)) et suggèrent que le complexe formé par E1 et E2 est important pour cette étape. Par ailleurs, alors que les particules virales seules traitées à pH acide ne sont pas compétentes pour fusionner, il a été montré que la liaison

de CD81 à E2 induisait probablement un changement conformationnel capable de rendre les particules virales sensibles au pH et donc compétentes pour la fusion. De manière intéressante, ce changement de conformation est transitoire et réversible en l'absence de membrane cible. En revanche, ce changement de conformation est stabilisé à pH acide (Sharma *et al.*, 2011). Une étude récente a montré que la fusion des particules virales avec la membrane des endosomes dépendait de changements conformationnels des hétérodimères E1E2. En effet, un réseau complexe d'interactions entre les deux glycoprotéines d'enveloppe a été mis en évidence à l'aide de différentes chimères entre deux souches de HCV. Il a notamment été montré qu'un domaine de E2 jouait un rôle primordial dans ces changements conformationnels (Douam *et al.*, 2014).

Par ailleurs, ce processus semble dépendant du cholestérol. En effet, la composition en cholestérol des particules virales est importante pour la fusion (Haid *et al.*, 2009). De plus, l'implication de NPC1 dans la fusion renforce l'importance du cholestérol dans cette étape, puisqu'il a été suggéré que ce transporteur de cholestérol pouvait initier la fusion en enrichissant les membranes en cholestérol (Sainz *et al.*, 2012). Par ailleurs, il a été montré que les HDLs pouvaient aussi augmenter le taux de fusion des particules de manière dépendante d'un échange de ApoC1 des HDLs vers les particules virales via SR-BI (Dreux *et al.*, 2007; Meunier *et al.*, 2005).

Si aujourd'hui de plus en plus d'éléments sont disponibles pour tenter d'expliquer le mécanisme de fusion par lequel le HCV relargue son ARN génomique dans le cytoplasme de sa cellule cible, il reste grandement méconnu. En particulier, l'absence de structure cristallographique complète de E1 et E2 ainsi que le manque de connaissance sur la structure formée par les complexes E1E2, rendent difficile l'appréhension de cette étape.

5- Transmission cellule-cellule

Comme nous l'avons déjà évoqué, le HCV infecte de nouvelles cellules par deux voies distinctes, une voie d'entrée via des virions sécrétés par la cellule infectée et une voie d'entrée pour laquelle le virus est directement transmis d'une cellule à une autre. C'est en effet une manière efficace pour les virus d'échapper aux anticorps neutralisants. Un tel mode de transmission a déjà été décrit avec, par exemple, la formation de synapses virologiques qui se forment entre deux cellules adjacentes, comme c'est le cas

pour le HIV (Jolly *et al.*, 2004). Dans le cas du HCV cependant, de telles structures n'ont pas pu être mises en évidence.

La transmission cellule-cellule du HCV a été décrite pour la première fois avec l'observation de foci de cellules infectées via la visualisation de l'ARN viral sur des tissus provenant de foies de patients infectés (Chang *et al.*, 2003; Wieland *et al.*, 2014). Les facteurs cellulaires impliqués dans cette voie d'entrée ont été étudiés et il a été montré que cette voie partageait de nombreux récepteurs avec la voie d'entrée classique. Ainsi, CLDN-1 est importante pour la transmission cellule-cellule (Brimacombe *et al.*, 2011; Timpe *et al.*, 2008). De même, OCLN est aussi impliquée dans cette voie (Brimacombe *et al.*, 2011; Ciesek *et al.*, 2011; Ploss *et al.*, 2009). Il en est de même pour SR-BI (Brimacombe *et al.*, 2011; Meuleman *et al.*, 2012) ainsi que pour l'EGF-R et EphA2 (Lupberger *et al.*, 2011). En revanche, le rôle de TfR dans cette voie apparaît moins important (Martin & Uprichard, 2013). Il a également été montré que l'ApoE associée aux particules virales était indispensable à la transmission cellule-cellule (Hueging *et al.*, 2014). Cependant, une étude récente n'a pas vu d'implication d'ApoE dans cette voie (Barretto *et al.*, 2014). En revanche, cette même étude a montré l'implication de NPC1L1 dans la transmission cellule-cellule (Barretto *et al.*, 2014).

Concernant le rôle de SR-BI dans la transmission cellule-cellule, il a été montré que ce facteur cellulaire serait impliqué dans une étape d'entrée post-attachement et indépendante de son interaction avec E2, suggérant que l'activité de transfert lipidique de SR-BI serait importante pour la transmission cellule-cellule (Zahid *et al.*, 2013). Cependant, certaines mutations d'adaptation peuvent rendre la transmission cellule-cellule indépendante de SR-BI (Catanese *et al.*, 2013).

L'implication de CD81, quant à elle, est beaucoup plus controversée. Ainsi, les premières études avaient montré que cette voie de transmission était indépendante de CD81. En effet, des cellules HepG2, déficientes en CD81, pouvaient être infectées en co-culture avec des cellules lymphoblastoïdes infectées (Valli *et al.*, 2007). Ces résultats ont été confirmés en réalisant des co-cultures de cellules HepG2 avec des cellules Huh-7.5 infectées en présence d'anticorps neutralisants, permettant d'empêcher la transmission des virions par la voie classique d'entrée (Timpe *et al.*, 2008). Des études similaires, utilisant des anticorps anti-CD81, ont abouti aux mêmes résultats *in vitro* et *in vivo* (Jones *et al.*, 2010; Meuleman *et al.*, 2008; Witteveldt *et al.*, 2008). Cependant, des études ont également montré que l'expression de CD81 restaurait la transmission cellule-

cellule avec des cellules incapables de transmettre le virus initialement (Brimacombe *et al.*, 2011; Potel *et al.*, 2013; Russell *et al.*, 2008). De plus, il a été montré qu'une molécule ciblant E2 et abrogeant son interaction avec CD81 pouvait abolir cette voie de transmission (Olaby *et al.*, 2014). Il est envisageable que deux voies de transmission cellule-cellule coexistent, l'une dépendante de CD81 et l'autre non. Ainsi, une étude utilisant à la fois des anticorps anti-CD81 et des anticorps neutralisants contre le HCV appuie cette hypothèse (Catanese *et al.*, 2013).

De manière intéressante, des molécules ciblant la protéine p7 affectent la transmission classique mais pas la transmission cellule-cellule, suggérant des différences dans l'assemblage et le trafic des particules selon leur voie de transmission (Meredith *et al.*, 2013).

Des études récentes ont montré que la transmission cellule-cellule pourrait se faire via des exosomes. En effet, une première étude réalisée à partir d'exosomes purifiés issus de cellules infectées, a permis de montrer que ces exosomes permettaient d'infecter de nouvelles cellules (Ramakrishnaiah *et al.*, 2013). Ces résultats ont été confirmés avec des exosomes purifiés à partir de séra de patients infectés (Bukong *et al.*, 2014). De manière intéressante, la transmission d'ARN viral aux pDCs, afin de permettre leur activation, se fait via des exosomes (Dreux *et al.*, 2012). Ceci est en accord avec une étude qui avait montré que la co-culture avec des cellules infectées était essentielle, la présence seule de particules virales libres ne permettant pas de médier une reconnaissance par les pDCs (Zhang *et al.*, 2013).

B- Traduction et réplication

1- Traduction et synthèse des protéines virales

Après la fusion et la décapsidation, l'ARN viral se retrouve dans le cytoplasme. Etant de polarité positive, il est directement traduit par la machinerie cellulaire. Grâce à l'IRES qui recoupe la région 5'UTR du génome et le début de la séquence du gène core, la sous-unité 40S ribosomale peut être recrutée (Pestova *et al.*, 1997; Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993). L'IRES permet aussi de recruter le facteur eIF3, et le complexe ainsi formé peut recruter encore deux autres facteurs essentiels à la traduction : eIF2 et eIF5, formant ainsi le complexe ribosomal 48S (Pestova *et al.*, 1997).

Enfin, la sous-unité 60S ribosomale est recrutée, aboutissant à la formation du complexe 80S fonctionnel (Locker *et al.*, 2007; Terenin *et al.*, 2008). Ce complexe permet alors la traduction de la polyprotéine (Hoffman & Liu, 2011). La synthèse du peptide signal situé dans la région C-terminale de la protéine core permet l'adressage de la polyprotéine au RE. Une fois dans le RE, la polyprotéine est maturée par des protéases virales et cellulaires (II) 2) d)).

2- Réplication de l'ARN viral

Une fois la polyprotéine virale maturée et clivée, les protéines non-structurales appartenant au complexe de réplication permettent la réplication de l'ARN viral. NS5B, la RdRP, permet la synthèse aussi bien des ARN(+) à partir des ARN(-) que l'inverse. Ce mécanisme de réplication est cependant asymétrique, puisqu'il produit jusqu'à dix fois plus d'ARN(+) que d'ARN(-).

L'ensemble des protéines virales nécessaires à la réplication sont regroupées sous le nom de réplicase virale. Celle-ci est constituée des protéines NS3 à NS5B. En effet, l'utilisation de réplicons subgénomiques a montré que ces protéines étaient nécessaires et suffisantes pour soutenir la réplication du HCV (Lohmann *et al.*, 1999). Hormis NS5B, le rôle exact des différentes protéines de la réplicase est méconnu. Les protéines NS3, NS5A et NS5B sont impliquées dans la reconnaissance de signaux pour la synthèse de l'ARN(+), et pourraient former un complexe initiant la synthèse (Binder *et al.*, 2007). La réplication a lieu au niveau du *membranous web*, une altération du RE induite notamment par NS4B (Egger *et al.*, 2002), mais également par d'autres protéines de la réplicase (Romero-Brey *et al.*, 2011). La protéine NS4A permet, outre son rôle de cofacteur pour la protéase NS3, de réguler la réplicase, notamment en agissant sur l'état de phosphorylation de NS5A (Lindenbach *et al.*, 2007). Le rôle du domaine hélicase de NS3 n'est pas connu, mais il pourrait permettre de séparer les ARNs double-brin formés au cours de la réplication, afin de permettre d'une part de libérer l'ARN(+) pour former les nouveaux virions, et d'autre part l'ARN(-) qui sert de matrice pour la synthèse de nouveaux brins (+) (Gu & Rice, 2010). Le rôle de NS5A au cours de la réplication est méconnu. Cette protéine a la faculté de lier un grand nombre de protéines virales et cellulaires, ainsi que l'ARN (Huang *et al.*, 2005). De manière intéressante, cette protéine

est capable de réguler la réplication, notamment via son état de phosphorylation (Ranjith-Kumar *et al.*, 2011; Shirota *et al.*, 2002).

Par ailleurs, des facteurs cellulaires ont été impliqués dans la réplication du HCV. Il s'agit notamment de hVAP-A, qui interagit plus particulièrement avec la forme hypophosphorylée de NS5A, cette dernière régulant positivement la réplication (Evans *et al.*, 2004). Les cyclophilines ont également été décrites comme importantes pour la réplication, notamment la cyclophiline A qui interagit essentiellement avec NS5A et induit probablement un changement de conformation lui conférant son activité au cours de la réplication (Huang *et al.*, 2005; Kaul *et al.*, 2009; Verdegem *et al.*, 2011). D'autres protéines comme PRK2 (*protein kinase C-related kinase 2*) (Kim *et al.*, 2004) ou encore GBF1 (*Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1*) (Goueslain *et al.*, 2009) ont aussi été décrites. Enfin, certains microARNs (miR), et plus particulièrement le miR122, sont essentiels à la réplication virale. L'importance de miR122 a été observée aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Hueging *et al.*, 2014; Jopling, 2005; Lanford *et al.*, 2010; Narbus *et al.*, 2011). Sa coexpression dans des cellules 293T avec ApoE et CLDN-1 suffit à restaurer un cycle complet dans ces cellules (Da Costa *et al.*, 2012). Il a été suggéré que sa fixation au sein de la région 5'-UTR de l'ARN viral permettrait de le protéger de la dégradation par des RNAses en recrutant des protéines telle que Ago2 (protéine Argonaute 2) (Shimakami *et al.*, 2012).

C- Assemblage et sécrétion

Les étapes d'assemblage et de sécrétion sont moins bien caractérisées du fait de l'absence, jusqu'en 2005 avec la mise en place des HCVcc (Wakita *et al.*, 2005), d'un modèle permettant de les étudier. L'assemblage commence dans un premier temps par le recrutement des différentes protéines, structurales et non-structurales nécessaires à l'assemblage, ainsi que de l'ARN génomique viral aux sites d'assemblage, notamment les GLs (Miyanari *et al.*, 2007). Après sa formation, la nucléocapside est enveloppée dans une membrane dérivée du RE et la particule virale mature en suivant la voie de sécrétion des VLDLs, pour enfin être sécrétée par exocytose (**Figure 21**).

La protéine core est capable à la fois de se lier à l'ARN viral (Boulant *et al.*, 2005) et, grâce à son domaine hydrophobe, d'interagir avec les membranes du RE dans un premier temps, puis avec les GLs (Boulant *et al.*, 2007). En effet, les GLs sont des

structures riches en triglycérides et en cholestérol dérivées du RE. Des facteurs cellulaires, acteurs de la formation des GLs tels que DGAT1, qui participe à la synthèse des triglycérides, et IKK α , un facteur de transcription important pour la lipogenèse, semblent pouvoir interagir avec la protéine core et favoriser son recrutement aux GLs (Herker *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013a). NS5A est également impliquée dans le processus d'assemblage, même si son implication exacte est méconnue. L'équilibre entre les formes hyperphosphorylée et hypophosphorylée semble réguler la transition de la réplication à l'assemblage. Ainsi, la forme hyperphosphorylée est associée à l'assemblage (Masaki *et al.*, 2014). Cette forme de NS5A est capable d'interagir avec core et peut être localisée au niveau des GLs (Masaki *et al.*, 2008; 2014). De manière intéressante, NS5A est aussi capable d'interagir avec ApoE, une apolipoprotéine clé dans l'assemblage du HCV (Benga *et al.*, 2009; Cun *et al.*, 2010). Enfin, Les glycoprotéines E1 et E2 sont, quant à elles, recrutées au niveau des GLs par l'intermédiaire de NS2, qui permet la formation d'un complexe constitué de ces trois protéines ainsi que de NS3 et p7 (Jirasko *et al.*, 2010; Popescu *et al.*, 2011). La protéine p7 permettrait, de part ses propriétés de transport de cations une fois oligomérisée, d'équilibrer le pH dans le compartiment de sécrétion des particules virales et donc d'éviter des changements conformationnels précoces, induits par un pH acide (Wozniak *et al.*, 2010). NS3, associée à NS4A, serait quant à elle impliquée dans l'encapsidation de l'ARN viral (Ma *et al.*, 2008b; Yi *et al.*, 2006). Enfin, des études ont montré que NS4B et NS5B étaient impliquées dans l'assemblage mais on ignore si ce rôle est direct ou indirect (Gouklani *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2009). L'association aux GLs semble être transitoire puisque différentes études ont montré une accumulation de protéines core au niveau des GLs dans le cadre de l'étude de mutants déficients pour l'assemblage (Boson *et al.*, 2011; Counihan *et al.*, 2011). En effet, les particules virales formées au niveaux des GLs migrent ensuite en utilisant les microtubules (Coller *et al.*, 2011).

Le mécanisme de bourgeonnement des particules virales est peu caractérisé et pourrait être la résultante des différentes forces exercées par la capsid naissante et par les glycoprotéines d'enveloppe (Vieyres *et al.*, 2013b). De plus, il a été montré que ApoB et le MTP (*Microsomal triglyceride-Transfer Protein*) sont essentiels à la sécrétion du HCV (Gastaminza *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007a). Or, ce sont des précurseurs de la formation des VLDLs, en particulier le MTP, qui permettent une accumulation de lipides à l'origine de la formation des VLDLs. Cette accumulation de lipides pourrait également

jouer un rôle dans le bourgeonnement des particules virales. Par ailleurs, l'importance de certaines protéines de la voie de sécrétion des VLDLs pour la sécrétion des particules virales telles que HSC70 (*Heat Shock Cognate protein 70*) (Parent *et al.*, 2009) ou HNF4 (*Hepatocyte Nuclear Factor 4*) (Li *et al.*, 2013b), renforce l'idée que les virions suivent la voie de sécrétion des VLDLs. La particule virale est ensuite maturée au cours de sa sécrétion, en incorporant différentes apolipoprotéines, notamment l'apolipoprotéine E (ApoE), potentiellement via des phénomènes de fusion avec les GLs présentes dans le compartiment de sécrétion (Boyer *et al.*, 2014; Hueging *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014b), ce qui leur permet d'acquérir leur faible densité. Enfin, les virions néo-formés seraient sécrétés par exocytose.

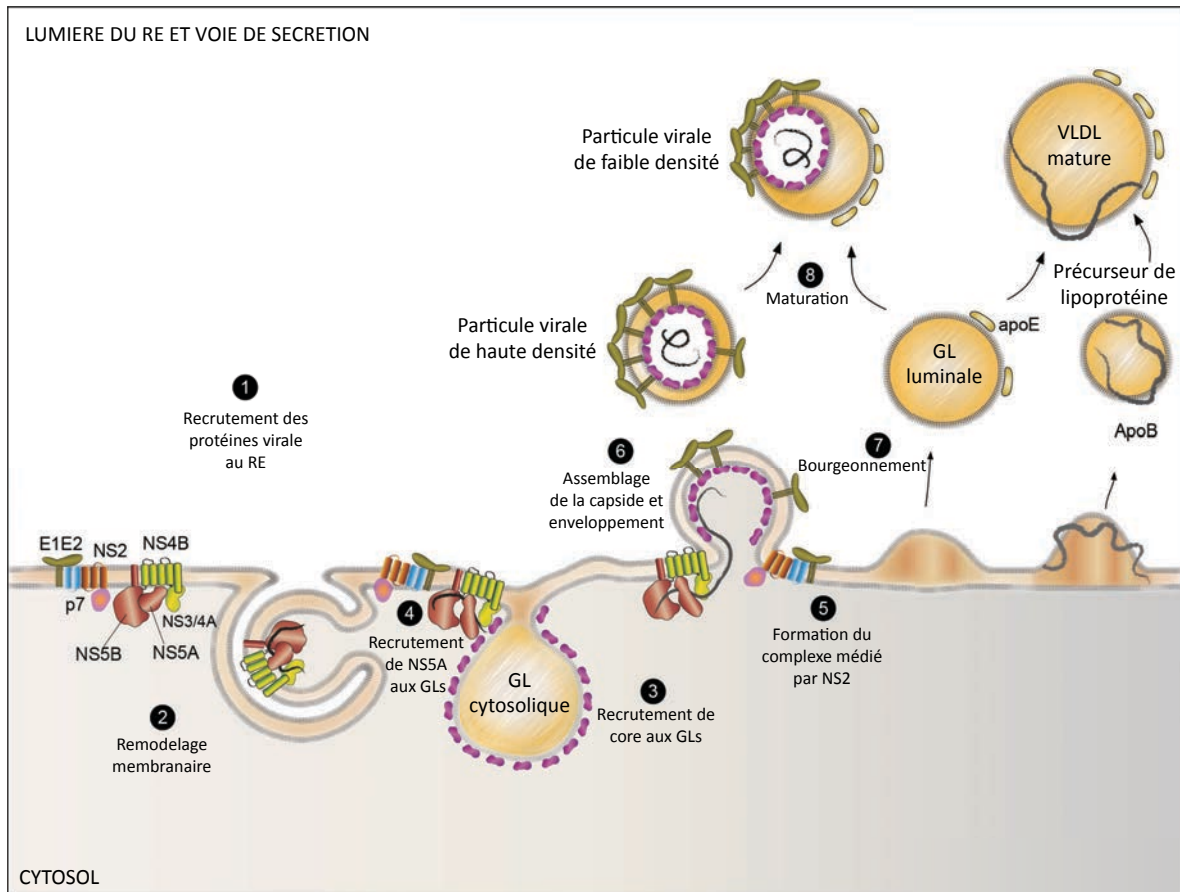


Figure 21 : Réplication et assemblage du HCV.

1) Après la synthèse des protéines virales, celles-ci sont recrutées au niveau du RE où la formation de la réplicase virale (NS3/4A, NS4B, NS5A et NS5B) a lieu, en association avec certains facteurs cellulaires tel que HVAP-A. **2)** NS4B induit la réorganisation des membranes du RE avec notamment la formation de vésicules à double membrane où a lieu la réplication. **3)** et **4)** L'assemblage débute avec le recrutement au niveau des GLs de la protéine core, des complexes de réplication grâce à l'interaction entre core, NS5A et des facteurs cellulaires telles que DGAT1 et IKK α , au niveau des GLs. **5)** La protéine NS2 permet la formation d'un complexe constitué de NS2, NS3, p7 et des glycoprotéines E1 et E2 ce qui permet leur recrutement aux GLs. **6)** Le complexe formé par NS2, les autres protéines de la réplicase ainsi que la protéine core permettent l'assemblage de la nucléocapside et l'enveloppement de la particule virale. **7)** Le bourgeonnement de la particule virale peut alors avoir lieu. **8)** Les particules virales sont maturées dans le compartiment de sécrétion où elles fusionnent avec des GLs lumineaux via l'interaction avec ApoE, en suivant la voie de sécrétion des VLDLs (D'après Popescu *et al.*, 2014).

IV- LA REPONSE IMMUNITAIRE AU HCV

A- Réponse immunitaire innée

1- Réponse interférons

a- Détection du HCV et induction de la réponse IFNs

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense face aux pathogènes. Elle a lieu entre autres via la réponse IFNs, et en particulier les IFNs de type I et III. Les IFNs de types I sont exprimés de façon ubiquitaire, mais sont majoritairement produits par les cellules dendritiques, notamment les cellules dendritiques myéloïdes (mDCs) et plus spécifiquement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), par les cellules de Küpffer, des macrophages résidant dans le foie, ainsi que par les cellules infectées. La production d'IFNs est élicitée par la reconnaissance de *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) via des *Pathogen-Recognition Receptors* (PRRs). Ces PAMPs peuvent être aussi bien des acides nucléiques que des peptides. Les PRRs sont représentés par des récepteurs de type TLRs (*Toll-Like Receptors*), RLRs (*RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene 1)-Like Receptors*) et NLRs (*Nod-Like Receptors*).

Le HCV est reconnu par les trois types de PRRs. Dans le cas de l'infection par le HCV, RIG-I est particulièrement important (Arnaud *et al.*, 2011; Foy *et al.*, 2005). Il reconnaît une séquence de 34 nucléotides poly-U dans la région 3'-UTR (Saito *et al.*, 2008; Uzri & Gehrke, 2009). Les protéines virales du HCV sont également reconnues à la surface cellulaire par le TLR2 (Chang *et al.*, 2007b; Dolganiuc *et al.*, 2004). TLR3 et TLR7 sont quant à eux capables de se lier à l'ARN viral au niveau des endosomes (Dreux *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2009). Enfin, le HCV induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules de Küpffer (Burdette *et al.*, 2012; Negash *et al.*, 2012). Plus récemment, il a été décrit que la Protéine Kinase R (PKR) était aussi capable de détecter le HCV via son ARN double brin et d'induire la réponse IFNs deux heures après l'infection, bien avant RIG-I (Arnaud *et al.*, 2011) (**Figure 22**).

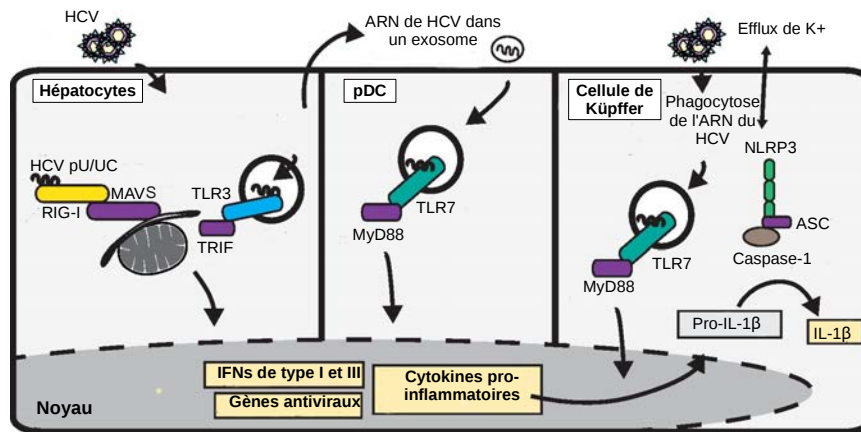


Figure 22 : Détection du HCV et induction de la réponse IFNs.

(D'après Horner, 2014)

Une fois détecté par ces récepteurs, différentes voies de signalisation permettent l'induction de l'expression et la sécrétion d'IFNs de type I et III, notamment via les voies de signalisation MAPK, NF- κ B ou encore IRF-3. Une fois sécrétés, ces IFNs induisent, à travers la voie de signalisation JAK/STAT (**Figure 23**), l'expression d'*Interferon-Stimulated Genes* (ISGs), à travers la voie de signalisation JAK/STAT (**Figure 23**), dont un certain nombre possède des propriétés antivirales connues.

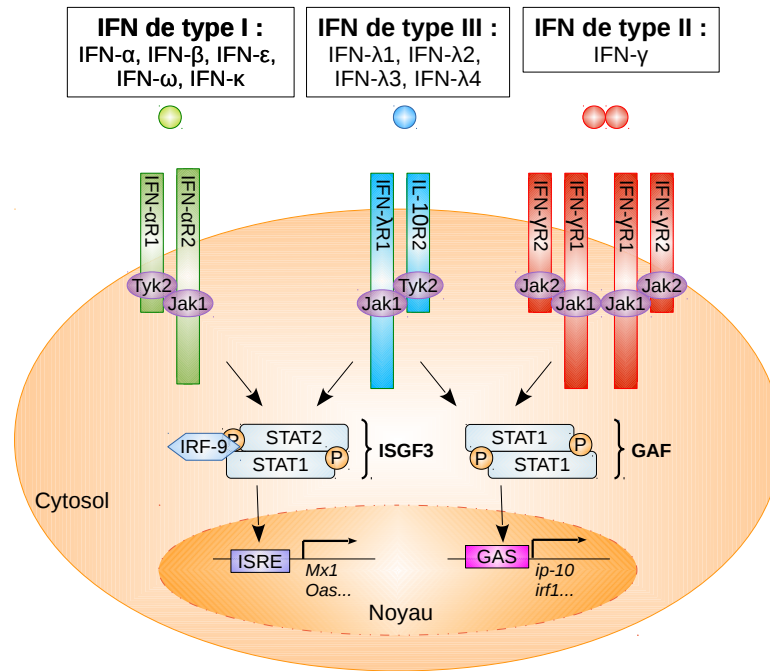


Figure 23 : Voies de signalisation des IFNs.

L'interaction entre les différentes molécules d'IFNs et leurs récepteurs respectifs induit notamment la phosphorylation des protéines STATs. Celles-ci forment différents complexes (ISGF3, GAF) qui sont transloqués au noyau où ils agissent comme des facteurs de transcription, induisant l'expression d'ISGs (D'après Donnelly & Kotenko, 2010).

Des expériences menées sur des chimpanzés ont mis en évidence que les ISGs étaient exprimés dans les jours suivant l'infection et que l'ampleur de la réponse dépendait de la charge virale (Bigger *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2002). Beaucoup d'ISGs se sont révélés avoir un effet antiviral contre le HCV (pour revue : (Wong & Chen, 2014). C'est ainsi le cas de la vipérine, qui bloque la réplication virale en interagissant avec NS5A (Helbig *et al.*, 2011). Les IFITM-1 et -3 (*IFN-Induced Transmembrane-1, -3*) quant à eux affectent l'entrée et la réplication virale, potentiellement en se liant à CD81 et CLDN-1, empêchant ainsi leur interaction, en redirigeant les particules virales vers une voie non productive ou en empêchant l'étape de fusion (Metz *et al.*, 2012; Wilkins *et al.*, 2013). La RNAaseL, une endonucléase qui clive les ARNs viraux et cellulaires après des dinucléotides UU et UA est capable d'affecter la traduction du HCV (Kwon *et al.*, 2013). Enfin, l'étape de sécrétion du HCV peut aussi être affectée par des ISGs comme la téthérine (Dafa-Berger *et al.*, 2012).

b- Echappement du HCV à la réponse IFNs

Le HCV a développé de multiples stratégies pour contourner cette réponse IFNs très précoce au cours de l'infection aiguë. Il échappe à cette voie en particulier en clivant des effecteurs de la voie d'induction de la réponse IFNs tels que MAVS grâce à l'activité protéase de NS3/4A, interférant ainsi avec la voie de signalisation de RIG-I (Baril *et al.*, 2009; Foy *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005b). NS3/4A est aussi capable de cliver TRIF (*TIR-domain-containing adapter-Inducing interFeron-β*), un adaptateur de TLR3, bloquant ainsi la voie de signalisation induite par ce dernier (Li *et al.*, 2005a). Egalement, la protéine NS5A en se liant à MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response gene 88*) atténue la voie de signalisation des TLRs (Abe *et al.*, 2007). Via la protéine core, le HCV est aussi capable de bloquer l'induction de la production d'IFNs par la voie de signalisation de TLR3 dans les cellules de Kuppfer (Tu *et al.*, 2010). De manière intéressante, afin de contrer l'expression des ISGs, le HCV active la PKR. En effet, cette kinase phosphoryle le facteur de traduction EIF2 α , bloquant ainsi la traduction des ARNs cellulaires et viraux simultanément dans les cellules infectées. L'ARN du HCV possédant une IRES, le virus n'est pas affecté par l'action de cette protéine (Garaigorta & Chisari, 2009). La protéine core du HCV est également capable d'augmenter l'expression de SOCS1/3 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 1/3*), ces dernières inhibant la voie de signalisation JAK/STAT en se liant notamment à la kinase JAK2 (Bode *et al.*, 2003).

2- Cellules NK

a- Généralités

Les cellules NK sont capables de détecter et de tuer les cellules infectées en libérant des molécules cytotoxiques telles que les granzymes et la perforine par dégranulation, mais aussi en induisant l'apoptose de leur cellule cible via une voie de signalisation Fas ou TRAIL (*Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*), ou encore via la sécrétion de TNF- α . Elles interviennent très rapidement au cours de la réponse innée et leur activité est contrôlée par un subtil équilibre entre les signaux inhibiteurs et activateurs induits par les récepteurs des cellules NK. Les récepteurs inhibiteurs reconnaissent des molécules du Complexe Majeur d'Histoincompatibilité de Classe I (CMH I), correspondant au système HLA de classe I chez l'Homme (*Human*

Leukocyte Antigens) qui présentent des molécules du soi. Les infections virales sont souvent accompagnées d'une diminution de l'expression des molécules du CMH-1. L'absence de ces molécules à la surface des cellules active les cellules NK : c'est la théorie du « soi manquant ». A l'inverse, les récepteurs activateurs reconnaissent des ligands qui témoignent d'un état de stress de la cellule. Les récepteurs inhibiteurs sont représentés par deux grandes familles, la famille des immunoglobulines, avec notamment les récepteurs KIRs (*Killer cells Ig-like Receptors*) et la famille des récepteurs apparentés aux lectines, tel que les récepteurs NKG2A et CD94. Les récepteurs activateurs sont quant à eux représentés par les récepteurs NCR (*Natural Cytotoxicity Receptor*) et KIRs ainsi que par des récepteurs apparentés aux lectines (NKG2-D, -C et -E). Les cellules NK sont également capables de sécréter un certain nombre de cytokines, tels que l'IFN- γ , l'IL-10 ou encore l'IL-21 qui régulent aussi bien l'immunité innée que l'immunité adaptative (Golden-Mason & Rosen, 2013).

b- Cellules NK et phase précoce de l'infection par le HCV

De manière intéressante, les cellules NK sont particulièrement présentes au niveau de foie, où elles jouent un rôle de sentinelles et sont particulièrement impliquées dans la réponse aux infections hépatotropiques (Crispe, 2009; Doherty & O'Farrelly, 2000). Les cellules NK interviennent très précocement au cours de l'infection par le HCV, même si ce rôle est encore méconnu (Amadei *et al.*, 2010). Il a été observé que l'infection par le HCV entraîne une augmentation de l'expression, dans les hépatocytes infectés, des ligands de NKp46, un récepteur activateur majeur dans la réponse cytotoxique (Golden-Mason *et al.*, 2012). De plus, des cellules NK qui expriment des niveaux élevés de ce récepteur inhibent plus fortement le HCV *in vitro* et corrélerent avec des niveaux d'ARNs viraux plus faibles *in vivo* (Golden-Mason *et al.*, 2012; Krämer *et al.*, 2012). Il a également été suggéré que les cellules NK pourraient induire la réponse des lymphocytes T (Pelletier *et al.*, 2010).

c- Cellules NK et infection chronique par le HCV

Le rôle des cellules NK dans l'infection chronique par le HCV a été longuement documenté mais de nombreuses informations contradictoires ont été publiées. Si chez

les patients chroniquement infectés par le HCV, on observe une diminution de la fréquence des cellules NK au niveau du foie (Meier *et al.*, 2005; Morishima *et al.*, 2006), le mécanisme de cette diminution est inconnu. Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence des modifications dans l'expression des récepteurs à la surface des cellules NK, modulant ainsi leur activité, mais aucun consensus n'a pu être établi. Il semblerait que le contact entre une cellule infectée et une cellule NK puisse modifier son profil d'expression de récepteurs (Yoon *et al.*, 2011) et ainsi réorienter l'activité des cellules NK, vers la cytotoxicité plutôt que vers la production de cytokines et en particulier d'IFN- γ , ce qui favoriserait la réplication virale (Ahlenstiel *et al.*, 2009; Oliviero *et al.*, 2009). Enfin, de nombreuses études ont montré un lien possible entre la glycoprotéine E2 et la dérégulation des cellules NK, pouvant mener à la chronicité de l'infection (pour revue Fénéant *et al.*, 2014, Annexe).

3- Cellules dendritiques

a- Généralités

Les DCs font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ce sont les cellules spécialisées dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Les DCs immatures sont tout d'abord recrutées, entre autres grâce à des chimiokines, aux sites d'inflammation. Elles sont ensuite activées soit par contact avec un pathogène, soit par des cytokines qui vont induire la capture de pathogènes dans le milieu extracellulaire par phagocytose, endocytose ou pinocytose. La reconnaissance des pathogènes se fait au niveau des PRRs en se liant à des PAMPs tels que les acides nucléiques, reconnus par des TLRs, ou des glycoprotéines via les lectines de type C. Les DCs vont alors commencer à présenter des peptides issus de pathogènes via les molécules du CMH II. Il s'en suit de nombreuses modifications dans le profil d'expression de récepteurs et de cytokines des DCs jusqu'à leur maturation. Les DCs matures migrent vers les tissus lymphoïdes grâce à l'expression du récepteur CCR7 (*C-C Chemokine Receptor type 7*) qui a pour ligand les chimiokines CCL21 et CCL19 (*C-C Chemokine 19/21*), sécrétées dans les organes lymphoïdes secondaires, où elles pourront activer les lymphocytes T et éliciter la réponse adaptative (Steinman & Hemmi, 2006).

b- Induction et inhibition de l'activité des DCs par le HCV

Les pDCs sont une population de DCs capable de produire une grande quantité d'IFNs de type I et III notamment, ce qui en fait des acteurs importants de l'immunité innée. En particulier, les pDCs peuvent induire une réponse IFNs importante, avec une production essentiellement d'IFN- α , et d'inhiber le HCV lorsqu'il est reconnu par TLR7 et RIG-I, via des exosomes contenant de l'ARN viral issus de cellules infectées (Dreux *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2010).

Cependant, cette production d'IFNs par les pDCs est inhibée par le HCV. En effet, la glycoprotéine E2 peut se lier à certains récepteurs de type lectines C (BDCA-2/3 et DCIR), ce qui inhibe la production d'IFNs par ces cellules (Florentin *et al.*, 2012). Ainsi, les particules virales libres circulantes induisent une régulation négative de la réponse IFNs dans les pDCs, en liant des récepteurs inhibiteurs de l'activité des pDCs, entrant ainsi en compétition avec la voie TLR7/RIG-I induite par l'ARN viral des exosomes issus de cellules infectées.

Il a également été montré que les particules virales circulantes, notamment via une interaction entre E2 et CD81 exprimée à la surface des DCs, pouvaient empêcher leur migration (pour revue Fénéant *et al.*, 2014, Annexe).

B- Immunité adaptative

Contrairement à l'immunité innée, qui débute dans les heures et jours suivant l'infection, l'immunité adaptative contre le HCV débute très tardivement, après un délai de 6 à 8 semaines (Shin *et al.*, 2011; Thimme *et al.*, 2012). Cette réponse immunitaire est le fait de deux acteurs majeurs : les lymphocytes B, acteurs de la réponse dite humorale, et les lymphocytes T.

1- Réponse humorale

La réponse humorale est médiée par les lymphocytes B. Les lymphocytes B matures migrent au niveau des organes lymphoïdes où ils entrent en contact avec leurs antigènes qui sont reconnus par les BCRs (*B Cell Receptors*). Cette première activation permet la sécrétion d'IgM et l'initiation des hypermutations somatiques dans les régions variables des gènes codant les immunoglobulines des BCRs. Ces mutations permettent

d'augmenter l'affinité pour les antigènes concernés. Plus tardivement, la commutation de classe permet, dans le cas du HCV, la production d'IgG.

Le rôle de la réponse humorale dans l'infection par le HCV est encore aujourd'hui controversé. Ainsi, il a été montré que des patients souffrant d'hypogammaglobulinémie, un déficit d'IgM et d'IgG, sont capables d'éradiquer l'infection (Christie *et al.*, 1997). De même, des études chez le chimpanzé ont montré que la production d'anticorps n'était pas nécessaire à la clairance du virus (Major *et al.*, 1999). Néanmoins, les patients développant une réponse humorale tardive, après l'établissement de la chronicité, semblent incapables d'éliminer le virus (Hahn *et al.*, 2007). De plus, l'étude d'une cohorte de patientes infectées par le même inoculum a révélé que les patientes ayant présenté une production tardive et faible d'anticorps neutralisants ont évolué vers la chronicité, à l'inverse des autres patientes (Pestka *et al.*, 2007).

La réponse humorale se développe essentiellement contre des épitopes situés dans les régions hypervariables de E2. Or les glycoprotéines d'enveloppe sont très peu immunogènes et soumises à de nombreuses mutations d'échappement, expliquant la mauvaise, de faible amplitude et tardive (de 8 à 20 semaines après l'infection) réponse humorale induite lors d'une primo-infection par le HCV (Logvinoff *et al.*, 2004; Netski *et al.*, 2005; Weiner *et al.*, 1992).

2- Réponse médiée par les lymphocytes T

a- Généralités

Le réponse adaptative contre le HCV est principalement médiée par les lymphocytes T ciblant de multiples épitopes dans les différentes protéines virales, structurales ou non (Cooper *et al.*, 1999; Thimme *et al.*, 2001; 2002). Les lymphocytes T se divisent en deux grandes populations, les lymphocytes T CD8⁺ ayant une activité cytotoxique et de production de cytokines pro-inflammatoires et les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires. Ces derniers sont eux-mêmes divisés en sous-populations, représentées majoritairement par les Th1, régulant positivement la réponse inflammatoire via un profil de sécrétion de cytokines constitué d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-2, et les Th2, favorisant la réponse humorale via la sécrétion d'IL-4, -5 et -13. Les lymphocytes T sont activés au niveau des organes lymphoïdes après reconnaissance entre les TCRs (*T Cell*

Receptors) à leur surface et les peptides présentés par les MHC de classe II à la surface des DCs ayant migré après leur activation depuis les sites d'infection.

b- Lymphocytes T et HCV

Les lymphocytes T CD4⁺ apparaissent comme des régulateurs centraux de l'infection en aidant les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes B, alors que les lymphocytes T CD8⁺ en sont les effecteurs clés. Des études menées *in vivo* sur des chimpanzés ont montré que lorsque l'on supprimait avec des anticorps le pool de lymphocytes T CD8⁺ avant l'infection sur des chimpanzés préalablement immunisés, ceux-ci devenaient chroniquement infectés par le HCV. Dès la fin de la neutralisation des lymphocytes T, l'infection pouvait être éliminée (Shoukry *et al.*, 2003). Une étude similaire conduite sur les lymphocytes T CD4⁺ a mené aux mêmes conclusions (Grakoui *et al.*, 2003). A l'inverse, un répertoire plus important et diversifié de lymphocytes T CD8⁺ chez le chimpanzé permet d'éviter les mutations d'échappement et donc de favoriser l'élimination du HCV (Meyer-Olson *et al.*, 2004). Il a par ailleurs été montré que la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ était plus importante dans le contrôle de l'infection que leur activité cytotoxique. Cependant, le mécanisme exact demeure inconnu (Jo *et al.*, 2012). Cette hypothèse est appuyée par le fait que les lymphocytes T CD8⁺ chez les patients chroniquement infectés sécrètent peu d'IFN- γ (Penna *et al.*, 2007). Alors que quelques années après la clairance de l'infection, des anticorps contre le HCV sont rarement détectés, des lymphocytes T mémoires (CD4⁺ et CD8⁺) sont trouvés chez les patients jusqu'à vingt ans après (Takaki *et al.*, 2000).

3- Echappement à la réponse immunitaire adaptative

Le HCV lutte contre cette réponse immunitaire en mutant constamment grâce à l'absence de mécanismes de relecture de la polymérase virale. Le virus génère ainsi des quasi-espèces virales (von Hahn *et al.*, 2007) sous la pression de sélection induite par les anticorps neutralisants et les lymphocytes T (Farci *et al.*, 1999; von Hahn *et al.*, 2007). Le développement de mutations d'échappement aux anticorps neutralisants est associé à la persistance du virus (Cox *et al.*, 2005). Ces mutations sont toutefois limitées par la compétitivité des génomes viraux ainsi produits (Oniangue-Ndza *et al.*, 2011).

L'association entre les particules et les LDLs et SR-BI est également un moyen de protéger la particules des anticorps neutralisants (Bartosch *et al.*, 2005), de même que la glycosylation de E2 (Falkowska *et al.*, 2007; Helle *et al.*, 2007). La transmission de cellule à cellule du HCV est également un moyen d'échapper aux anticorps neutralisants (Brimacombe *et al.*, 2011; Timpe *et al.*, 2008).

Il a aussi été montré que le HCV était capable d'affecter la réponse des lymphocytes T en les « épuisant » via une stimulation chronique de ces derniers. Les lymphocytes T perdent alors peu à peu leurs fonctions, ce qui se traduit par la diminution de la sécrétion d'IL-2, de TNF- α et surtout d'IFN- γ , ainsi que par une perte de leur cytotoxicité (Wherry *et al.*, 2003). Il a été suggéré, entre autre, que la protéine core, en inhibant la voie Lck/Akt activatrice dans les lymphocytes T, pouvait expliquer cette perte de fonction (Yao *et al.*, 2004). L'augmentation de l'expression de PD-1, un récepteur inhibiteur, à la surface des lymphocytes T est aussi impliquée dans ce processus (Kasprowicz *et al.*, 2008).

L'interaction entre les particules virales circulantes et la tétraspanine CD81 à la surface des lymphocytes B et de certaines population de lymphocytes T est associée à de nombreux dérèglements de la réponse immunitaire adaptative (pour revue : Fénéant *et al.*, 2014, Annexe).

Un résumé des réponses immunitaires innée et adaptative à l'infection par le HCV est présenté dans la **Figure 24**.

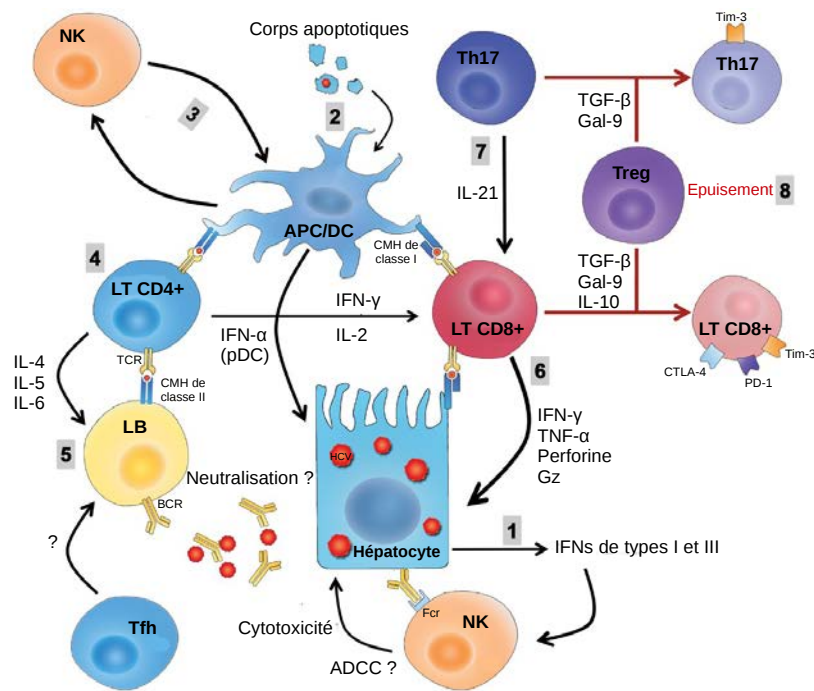


Figure 24 : Résumé de la réponse immunitaire innée et adaptative à l'infection par le HCV.

1) L'infection des hépatocytes induit la sécrétion d'IFNs de types I et III, créant un état antiviral dans les cellules voisines, hépatocytes ou non. **2)** Les DCs et autres cellules présentatrices d'antigènes (APC) absorbent par phagocytose/endocytose des particules virales et présentent des antigènes aux lymphocytes T CD8⁺ (LT CD8⁺) et aux lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4⁺) via les CMH I et II respectivement. **3)** Les cellules NK (NK) et les DCs interagissent afin de stimuler leur activité. **4)** Les LT CD4⁺ jouent le rôle d'auxiliaire afin de favoriser l'activation des lymphocytes B (LB), mais également celle des LT CD8⁺. **5)** Les LB pourraient participer à l'élimination du virus en sécrétant des anticorps neutralisants et pourraient être aidés par la sous-classe de lymphocytes T helper que sont les Tfh. **6)** Les LT CD8⁺ exercent leur activité antivirale soit par leur activité cytotoxique avec sécrétion de perforine et de granzymes (Gz), soit par sécrétion de certaines cytokines. **7)** Les lymphocytes T helper Th17 entretiennent l'activité des LT CD8⁺ en sécrétant de l'IL-21. **8)** Une diminution du nombre de Th17 et un changement du profil de sécrétion de cytokines favorisent l'activité des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui modifient à leur tour le profil d'expression des récepteurs à la surface des LT CD8⁺, conduisant à leur « épuisement » (D'après (Abdel-Hakeem & Shoukry, 2014)).

V- LES TRAITEMENTS CONTRE LE HCV

A- La bithérapie IFN/Ribavirine

Après les résultats encourageants d'une étude pilote menée en 1986 pour tester l'efficacité de l'IFN- α recombinant sur le HCV (Hoofnagle *et al.*, 1986), une monothérapie basée sur l'IFN- α a été utilisée. Les patients étaient alors traités pendant 24 semaines avec 3 doses par semaine. Cependant, le taux d'efficacité n'était que de 15 à 20% (Poynard *et al.*, 1995). L'efficacité du traitement est caractérisée par une réponse virologique soutenue (SVR), c'est-à-dire la non détection de l'ARN viral pendant les 6 mois suivant la fin du traitement.

L'IFN- α agit comme un modulateur de l'immunité innée et acquise. En effet, il induit non seulement un état antiviral dans les cellules non infectées via l'induction de l'expression d'ISGs ayant un effet antiviral sur le HCV, mais il joue également un rôle dans la stimulation des cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative. C'est donc un traitement non spécifique du HCV.

Afin d'améliorer l'efficacité du traitement, une bithérapie utilisant de la Ribavirine a été développée à la fin des années 1990. La Ribavirine est une molécule antivirale dont le mécanisme d'action exact n'est pas encore connu. Plusieurs mécanismes ont été proposés. Ainsi, il se pourrait que la Ribavirine inhibe la synthèse du GTP, inhibant par conséquent la réplication virale. Il est également possible que cette molécule augmente considérablement le taux de mutations du HCV ou que, de part sa qualité d'analogie de nucléoside, elle soit incorporée lors de la réplication virale. Enfin, il a été proposé que la Ribavirine pouvait agir au niveau de la réponse immunitaire en modifiant le ratio de lymphocytes T helper 1 et 2 ainsi qu'en favorisant la voie de signalisation JAK/STAT et donc la réponse IFN (Paeshuyse *et al.*, 2011). Il a aussi été proposé que la Ribavirine pouvait entraîner des modifications épigénétiques des gènes des ISGs, rendant l'induction de ces derniers par un l'IFN- α plus efficace (Testoni *et al.*, 2013). L'effet synergique de la combinaison IFN- α /Ribavirine a augmenté l'efficacité du traitement à 38% de SVR (McHutchison *et al.*, 1998).

Au début des années 2000, afin d'améliorer l'efficacité du traitement et d'en faciliter la prise, une forme recombinante d'IFN- α , à laquelle a été ajoutée une molécule de polyéthylène glycol, a permis d'augmenter la demi-vie de l'IFN- α ainsi que son

efficacité dans l'organisme et de réduire la prise à une dose par semaine au lieu de trois (Lindsay *et al.*, 2001). Ceci a permis d'augmenter le taux de SVR jusqu'à 55% en moyenne (Fried *et al.*, 2002).

L'usage d'IFN- α s'accompagne cependant de très nombreux et lourds effets secondaires, notamment des nausées, myalgies, maux de tête, anorexie ou encore dépressions et syndromes grippaux. C'est pour cette raison qu'un traitement permettant de se passer d'IFN- α a pendant longtemps été recherché. De plus, l'efficacité de cette bithérapie est dépendante du génotype et est assez peu efficace sur les génotypes 1, 4, 5 et 6, alors qu'elle permet de résoudre 80% des hépatites C chroniques dues aux génotypes 2 et 3.

B- Les molécules ciblant directement le virus

Les molécules ciblant directement le virus (DAAs) sont les molécules qui permettent d'inhiber directement les activités de certaines protéines virales. Depuis 2011, quelques DAAs ont été approuvées et un grand nombre est actuellement en phases cliniques.

1- Les inhibiteurs de protéase

Afin d'augmenter le taux de SVR chez les patients infectés par le HCV de génotype 1, des inhibiteurs de la protéase NS3/4A de première génération ont été développés. Ainsi, l'arrivée sur le marché du Bocéprévir (Poordad *et al.*, 2011) et du Télaprévir (Jacobson *et al.*, 2011) a permis d'augmenter jusqu'à 75% le taux de SVR. Ces molécules se fixent au niveau du site catalytique de l'enzyme et bloquent ainsi la suite de la maturation post-traductionnelle de la polyprotéine virale. L'apparition rapide de mutants de résistance à ces deux molécules implique de les utiliser en combinaison avec l'IFN- α -pegylé et la Ribavirine. D'autres inhibiteurs de la protéase NS3/4A de première génération, efficaces contre les génotypes 1, 2 et 4, sont actuellement en essai clinique de phase II et III et un inhibiteur a été récemment approuvé, le Siméprévir (Rosenquist *et al.*, 2014).

Des inhibiteurs de seconde génération de la protéase NS3/4A sont aussi en cours d'essai clinique de phase II et III. Ces inhibiteurs ont une activité pangénotypique, bien que l'efficacité soit variable d'un génotype à l'autre. De plus, ces inhibiteurs sont moins susceptibles d'entraîner des résistances (Pawlotsky, 2014).

2- Les inhibiteurs de la polymérase virale

Dans un premier temps, des inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques ont été étudiés. Ces inhibiteurs sont incorporés par NS5B lors de la réplication et entraînent un arrêt précoce de la synthèse d'ARN. Ces inhibiteurs sont particulièrement intéressants car ils sont d'une part efficaces sur tous les génotypes et d'autre part entraînent rarement des mutations de résistance. En effet, les mutants de NS5B ainsi générés permettent rarement des taux de réplication suffisants au maintien de l'infection. Récemment, en 2014, le Sofosbuvir a été mis sur le marché (Lawitz *et al.*, 2013). L'introduction du Sofosbuvir dans la thérapie contre le HCV permet d'atteindre plus de 90% de SVR, et ce avec différents génotypes et à des stades plus ou moins avancés de la maladie, avec notamment des patients présentant des cirrhoses ou des fibroses. De plus, cette molécule permet de réduire la durée du traitement (Pawlotsky, 2014). Des inhibiteurs non nucléotidiques sont également en cours d'essais cliniques de phase II et III. Ces inhibiteurs se lient à des sites allostériques de NS5B et inhibent son activité en induisant des changements conformationnels (Haudecoeur *et al.*, 2013).

3- Les inhibiteurs de NS5A

Les inhibiteurs ciblant NS5A ont la capacité de se fixer au niveau du domaine I de la molécule et par un mécanisme encore inconnu, permettent d'inhiber l'activité de NS5A dans la réplication, mais également dans l'assemblage et la sécrétion (McGivern *et al.*, 2014; Pawlotsky, 2013). Les inhibiteurs de NS5A de première génération sont efficaces contre les génotypes 1 et 4 et entraînent fréquemment l'apparition de résistances. Ainsi, le Daclatasvir est en voie d'être approuvé et bénéficie en France d'une autorisation temporaire d'utilisation (Gao *et al.*, 2010). De nombreuses autres molécules sont en essais cliniques de phase II et III. Des inhibiteurs de seconde génération sont

également étudiés et permettent de cibler l'ensemble des génotypes sans toutefois résoudre complètement le problème lié à l'apparition de résistances.

Les stratégies de thérapie actuelles et envisagées suite à l'arrivée sur le marché de nouvelles molécules, sont résumées dans le **tableau 1**.

Génotype	Thérapie	Durée du traitement
1	Siméprévir + IFN α -pegylé + Ribavirine	24-48 semaines
	Sofosbuvir + IFN α -pegylé + Ribavirine	12 semaines
	Faldaprévir + IFN α -pegylé + Ribavirine	24-48 semaines
	Daclatasvir + IFN α -pegylé + Ribavirine	24 semaines
	Asunaprevir + Daclatasvir + IFN α -pegylé + Ribavirine	24 semaines
	Sofosbuvir + Ribavirine (IFN-intolérants, pré-transplantation)	24 semaines – jusqu'à transplantation
	ABT-450/r + Ombitasvir + Dasabuvir +/- Ribavirine	12 semaines
	Sofosbuvir + Siméprévir +/- Ribavirine	12 semaines
	Sofosbuvir + Faldaprévir +/- Ribavirine	12 semaines
	Sofosbuvir + Daclatasvir +/- Ribavirine	12-24 semaines
Sofosbuvir + Lédirasvir +/- Ribavirine	8-12 semaines	
2	Sofosbuvir + Ribavirine	12-16 semaines
3	Sofosbuvir + IFN α -pegylé + Ribavirine	12 semaines
	Sofosbuvir + Ribavirine	24 semaines
	Sofosbuvir + Daclatasvir +/- Ribavirine	12 semaines
4	Sofosbuvir + IFN α -pegylé + Ribavirine	12 semaines
	Sofosbuvir + Ribavirine (IFN-intolérants, pré-transplantation)	24 semaines – jusqu'à transplantation
	Siméprévir + IFN α -pegylé + Ribavirine	24-48 semaines
	Sofosbuvir + Siméprévir +/- Ribavirine	12 semaines
	Sofosbuvir + Daclatasvir +/- Ribavirine	12-24 semaines
	Sofosbuvir + Lédirasvir +/- Ribavirine	8-12 semaines
5 et 6	Sofosbuvir + IFN α -pegylé + Ribavirine	12 semaines
	Sofosbuvir + Ribavirine (IFN-intolérants, pré-transplantation)	24 semaines – jusqu'à transplantation

Tableau 1 : Stratégies de traitement actuelles et à venir.

Les inhibiteurs de protéase sont indiqués en rouge, les inhibiteurs de la polymérase virale en vert et les inhibiteurs de NS5A en bleu. /r : traitement boosté au ritonavir, une molécule inhibant les protéines qui éliminent les inhibiteurs de protéase (d'après Pawlotsky, 2014).

4- Autres cibles virales potentielles

D'autres cibles virales ont été envisagées. Il s'agit notamment des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. En effet, cibler l'entrée du virus serait une stratégie particulièrement intéressante dans le cadre de traitements de patients chroniquement infectés et venant de subir une transplantation hépatique. En effet, cela pourrait éviter la réinfection du greffon. Les anticorps neutralisants sont efficaces, mais malheureusement

ils se heurtent à la grande variabilité des glycoprotéines d'enveloppe (Angus & Patel, 2011; Zeisel *et al.*, 2011).

La protéine p7 est également une cible intéressante. Cependant, les premières études portant sur l'utilisation d'inhibiteurs de viroporines, telle que l'amantadine qui inhibe la protéine M2 du virus Influenza, n'ont pas donné de résultats concluants (Steinmann & Pietschmann, 2010).

Enfin, des études ont montré que la silibiline, une molécule utilisée dans le cadre de traitements et de préventions de diverses maladies du foie, était capable d'améliorer la réponse au traitement contre le HCV. Or, des études suggèrent que cette molécule a pour cible NS4B (Esser-Nobis *et al.*, 2013).

C- Les molécules ciblant la cellule hôte

De nombreuses protéines cellulaires et micro ARNs sont essentiels aux différentes étapes du cycle de réplication du virus. Cibler ces différents éléments a l'avantage de limiter l'apparition de mutants de résistance et permet une efficacité contre l'ensemble des génotypes. Plusieurs inhibiteurs sont actuellement en cours d'essai clinique. Il s'agit notamment d'inhibiteurs de la CypA, une protéine essentielle à la réplication du HCV, évoquée auparavant (Coelmont *et al.*, 2009). Un antagoniste de miR122, un micro ARN clé dans la réplication virale, est également en essai clinique de phase II. Cette antagoniste empêche la liaison entre miR-122 et la région 5'-UTR du HCV (Janssen *et al.*, 2012). Cependant, contrairement aux molécules précédentes, cet antagoniste nécessite une injection et ne peut être délivré par voie orale.

D'autres molécules sont également à l'étude mais à des stades moins avancés. Ainsi, cibler certains facteurs d'entrée pourrait se révéler efficace. Des études se sont intéressées notamment à neutraliser SR-BI *in vitro* et *in vivo*, soit en utilisant des anticorps (Lacek *et al.*, 2012; Meuleman *et al.*, 2012) soit en utilisant des antagonistes, telle que la molécule ITX-5061 (Syder *et al.*, 2010). Des anticorps dirigés contre CD81 sont également capables d'empêcher l'infection *in vivo*, faisant d'eux des outils intéressants dans le cadre de transplantations hépatiques (Meuleman *et al.*, 2008). De plus, des inhibiteurs de EGF-R (Lupberger *et al.*, 2011) et de NPC1L1 (Sainz *et al.*, 2012) sont efficaces *in vitro*.

D- Recherche d'un vaccin

La meilleure solution pour lutter contre le HCV serait de réussir à développer une stratégie de vaccination efficace. De nombreuses recherches sont faites à ce sujet et visent à développer aussi bien un vaccin prophylactique, qu'un vaccin thérapeutique, mais aucun n'est encore disponible. En effet, la grande difficulté réside non seulement dans l'existence de nombreux génotypes et sous-types viraux, mais également dans la fréquence importante des mutations chez les patients infectés et l'existence de quasi-espèces virales. De plus, la difficulté liée à la disponibilité des modèles animaux immunocompétents pour tester ces vaccins est également un frein à leur développement.

La vaccination prophylactique vise essentiellement à induire une réponse humorale au HCV et ainsi d'empêcher que des cellules ne soient infectées. Elle cible donc essentiellement les glycoprotéines d'enveloppe. La plupart des anticorps neutralisants produits naturellement chez les patients infectés est dirigée contre E2, et plus particulièrement contre la région HVR1, hautement variable au sein d'un même patient. Des essais de vaccination sur des chimpanzés ont montré que ces derniers pouvaient produire des anticorps neutralisants suite à une immunisation avec des protéines E1 et E2 recombinantes purifiées (Choo *et al.*, 1994). Cette étude a montré que la majorité des chimpanzés était protégée d'une infection par le HCV. Une étude a également montré que l'utilisation d'anticorps neutralisants issus de séra de patients permet de protéger des chimpanzés de l'infection (Morin *et al.*, 2011). Plus récemment, il a été montré que des HCVcc inactivés étaient capables d'induire des anticorps capables de protéger des souris humanisées de l'infection (Akazawa *et al.*, 2013). De même, l'utilisation de VLPs pseudotypées par les glycoprotéines d'enveloppe du HCV permet d'induire la production d'anticorps neutralisants chez la souris et le macaque, efficaces sur de nombreux génotypes du HCV (Garrone *et al.*, 2011). Quelques vaccins prophylactiques sont actuellement en essais cliniques de phases I et II, notamment le vaccin HCV E1E2/MF59C.1, basé sur des protéines E1E2 recombinantes (Frey *et al.*, 2010).

Dans le cas de l'infection par le HCV, la réponse humorale est tardive et la réponse aux lymphocytes T est bien souvent peu efficace. De plus, le fait que le virus puisse échapper à la réponse humorale en se transmettant directement de cellule à cellule, met l'accent sur l'importance de la réponse aux lymphocytes T dans le cadre d'un

vaccin thérapeutique. C'est pourquoi la recherche de vaccins thérapeutiques s'est tournée vers les vaccins à ADN. En effet, ces vaccins reposent principalement sur la transfection d'un plasmide codant un ou plusieurs antigènes viraux. La transfection de ces plasmides permet alors d'éliciter la réponse aux lymphocytes T par les cellules exprimant les antigènes viraux. Différentes stratégies ont été développées afin de délivrer cet ADN aux cellules humaines.

Des plasmides nus, dont le niveau de transfection a été augmenté à l'aide de pistolets géniques ou d'électroporations locales par exemple, ont été développés. Ces plasmides codent généralement la protéine NS3, particulièrement reconnue par les lymphocytes T (Diepolder *et al.*, 1998), mais également la protéine core, très conservée, ainsi que E1 et E2. Le vaccin ChronVac-C®, codant la protéine NS3/4A, est actuellement en essai clinique de phase II (Fournillier *et al.*, 2013).

Afin de faciliter l'expression par les cellules d'antigènes viraux, des vecteurs viraux ont été utilisés. Ainsi, l'utilisation de vaccins basés sur des vecteurs adénoviraux permet d'améliorer les vaccins à ADN. L'utilisation de souches d'adénovirus dont la prévalence de l'infection chez l'Homme est faible, tels que les Ad6 et ChAd3 a montré qu'ils induisaient une réponse aux lymphocytes T contre le HCV importante chez l'Homme (Barnes *et al.*, 2012). D'autres vecteurs viraux, tels que le virus de la vaccine Ankara modifiée ou des alphavirus ont été testés. Le vaccin TG4040, basé sur le virus de la vaccine et exprimant les protéines NS3, NS4A, NS4B et NS5B, est ainsi en essai clinique de phase II, après des résultats prometteurs en phase I (Ray, 2011).

Des vaccins basés sur des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) recombinantes sont également à l'étude. Le vaccin GI-5005 (Haller *et al.*, 2007), exprimant une protéine de fusion NS3-core, est actuellement en essai clinique de phase II.

Enfin, des vaccins basés sur des DCs ou des précurseurs des DCs prélevés et modifiés génétiquement *ex vivo* sont un nouvel outil thérapeutique intéressant (Banchereau *et al.*, 2001). Un tel vaccin, basé sur des DCs dérivées de macrophages et présentant à leur surface des épitopes de core, NS3 et NS4B, a été testé en essai clinique de phase I (Gowans *et al.*, 2010).

Pour finir, en plus des vaccins à ADN, des vaccins basés sur des peptides recombinants ont également été testés dans le cadre de vaccins thérapeutiques. Ainsi des vaccins personnalisés avec des peptides de différentes protéines virales ont été utilisés en essai clinique de phase I (Yutani *et al.*, 2007). D'autres vaccins avec des

peptides standardisés ont également été testés (Klade *et al.*, 2008; Schlaphoff *et al.*, 2007).

Malheureusement, jusqu'à présent, l'ensemble de ces stratégies thérapeutiques n'a pas montré d'efficacité suffisante pour guérir de l'infection, et ce même s'ils permettent une réponse immunitaire satisfaisante.

VI- RESISTANCE NATURELLE AU HCV ET FACTEURS DE PREDICTION DE L'EVOLUTION DE LA MALADIE

A- Facteurs de risques

Afin de déterminer les mécanismes de résistance à l'infection par le HCV, il est primordial de déterminer quels sont les facteurs de risques majeurs de transmission de la maladie. En effet, c'est en étudiant les populations les plus à risque que l'on peut identifier les causes potentielles de résistance au HCV au sein de ces populations. Les co-infections HCV/HIV sont fréquentes et s'expliquent par des similitudes dans les modes de transmission de ces deux virus. Cependant, alors que le HCV se transmet dix fois plus facilement via le sang que le HIV, il se transmet beaucoup moins efficacement, contrairement au HIV, par voie sexuelle (Sulkowski & Thomas, 2003). Ainsi, des études réalisées sur des cohortes de patients mono-infectés par le HCV ou co-infectés par le HIV ont permis de déterminer que la prise de drogue par voie intraveineuse, les tatouages, l'incarcération (notamment via une exposition au sang lors de rixes), le partage d'objets personnels tels que des rasoirs ou des brosses à dent étaient des facteurs de risques. Les transfusions sanguines ont également été pendant longtemps une source de contamination par le HCV (Bollepalli *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2000). Parmi ces facteurs de risque, l'utilisation de drogue par voie intraveineuse est aujourd'hui le plus important. Dans certaines cohortes, jusqu'à plus de 70% des patients infectés par le HCV sont toxicomanes (Bollepalli *et al.*, 2008; Cameron *et al.*, 2013). Parallèlement, un plateau de 90% de toxicomanes est infecté par le HCV après 15 à 20 ans d'injections (Castro-Sánchez *et al.*, 2012; Hagan *et al.*, 2008; Sutton *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 1995; Tseng *et al.*, 2007).

Ainsi, l'étude de cohortes de patients fortement exposés au HCV mais non infectés permet d'identifier des facteurs expliquant la résistance apparente de ces patients. Cependant, il est important de garder en mémoire qu'il est parfois difficile de faire la distinction entre les patients non infectés et ceux ayant été infectés par le passé. En effet, après un certain nombre d'années variant entre 7 et 25 ans, des cas de séroréversions ont été observés (Kondili *et al.*, 2002; Rodger *et al.*, 2000; Takaki *et al.*, 2000).

B- Système immunitaire

1- *IL28B* et *IFNL4*

a- Les IFN- λ s

Le gène *IL28B* code l'IFN- λ 3 et le gène *IFNL4* code l'IFN- λ 4. Les IFN- λ s appartiennent à la famille des IFNs de type III. On dénombre quatre IFN- λ s, les IFN- λ 1, - λ 2 et - λ 3 (ou respectivement IL29, IL28A et IL28B) et - λ 4, dont les gènes sont situés sur le chromosome 19 (Kotenko *et al.*, 2003; Prokunina-Olsson *et al.*, 2013; Sheppard *et al.*, 2003). A ce cluster s'ajoute un pseudogène, l'IFN- λ 4 Ψ (Hamming *et al.*, 2010). Les IFN- λ s peuvent être produits par l'ensemble des cellules de l'organisme en réponse à une infection virale et même à des infections bactériennes et parasitaires, essentiellement quand ces dernières sont intracellulaires. La reconnaissance des agents pathogènes se fait via des récepteurs intracellulaires tels que certains récepteurs Toll-Like, RIG-I ou encore MDA5. Ces récepteurs vont reconnaître majoritairement de l'ADN ou de l'ARN, mais ils peuvent aussi reconnaître des glycoprotéines virales (Iversen & Paludan, 2010).

Les IFN- λ s ont pour récepteur un complexe formé par une chaîne protéique spécifique des IFN- λ s, l'IFN- λ R1 (ou IL-28RA), et une chaîne commune aux récepteurs des IL-10, -22 et -26, l'IL-10R2 (Donnelly *et al.*, 2004; Hör *et al.*, 2004; Kotenko *et al.*, 1997; 2001; Sheikh *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2000). La voie de signalisation induite par l'interaction entre les IFN- λ s et leur récepteur est similaire à la voie de signalisation induite par les IFNs de type I. Ainsi les IFN- λ s entraînent la formation d'un complexe facteur de transcription, ISGF3, constitué des protéines STAT1, STAT2, activées via par la phosphorylation de résidus tyrosine, et IRF-9 (ou p48) via l'activation des kinases *Janus* Jak1 et Tyk2 et la phosphorylation du domaine intracellulaire de l'IFN- λ R1 (Dumoutier *et al.*, 2004; Kotenko *et al.*, 2003). D'autres protéines STATs peuvent aussi être activées par les IFN- λ s, telles que les protéines STAT3, STAT4 et STAT5 (Dumoutier *et al.*, 2003). Ce complexe est alors transloqué jusqu'au noyau où il s'attache à des éléments de réponses aux IFNs situés dans les promoteurs des gènes stimulés par les IFNs tels que OAS1 ou MX1, ce qui corrèle avec l'activité antivirale des IFNs de type I et III (Brand *et al.*, 2005a, b; Kotenko *et al.*, 2003; Marcello *et al.*, 2006). De manière intéressante, la voie de signalisation via les IFN- λ s semble régulée par un rétrocontrôle négatif via l'expression du gène inhibiteur SOCS1 (Brand *et al.*, 2005b). Une autre voie

de signalisation est également possible via l'homodimérisation de STAT1, formant alors le complexe facteur de transcription GAF (*Gamma-IFN Activation Factor*) qui, une fois transloqué au noyau, reconnaît des séquences GAS (*Gamma-IFN Activated Sequence*) dans des gènes stimulés par les IFNs de type II (**Figure 23**). Si les voies de signalisations induites par les IFNs de types I et III et les gènes induits sont similaires, en revanche, l'amplitude et les cinétiques d'induction sont différentes (Bolen *et al.*, 2014).

Contrairement aux IFNs de type I, pour lesquels les récepteurs sont exprimés de façon ubiquitaire, le récepteur aux IFN- λ s est essentiellement restreint aux cellules épithéliales telles que les kératinocytes. Certaines cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes B et les DCs expriment aussi ce récepteur, conférant un rôle des IFN- λ s dans la réponse immunitaire adaptative. Cependant, le rôle attribué aux IFN- λ s dans la réponse immunitaire adaptative est controversé étant donné que selon les études, les IFN- λ s induisent l'augmentation ou la diminution des niveaux d'expression des lymphocytes T régulateurs dans la rate via la réponse des DCs aux IFN- λ s (Lasfar *et al.*, 2006; Morrow *et al.*, 2009; Sommereyns *et al.*, 2008; Witte *et al.*, 2009).

b- Rôle antiviral des IFN- λ s

Il a été montré que les IFN- λ s étaient capables d'inhiber la réplication d'un certain nombre de virus. Ainsi, le Virus de l'Herpès Simplex de type 1 (HSV-1) voit sa réplication inhibée dans les astrocytes via les IFN- λ 1 et - λ 2 (Li *et al.*, 2010). Le virus Influenza A (IAV) est également inhibé dans des cellules traitées par les IFN- λ 2 et - λ 3 via l'induction de l'expression de MxA et OAS (Svetlikova *et al.*, 2010). La réplication des rhinovirus est également bloquée par un traitement aux IFN- λ s dans les cellules épithéliales bronchiques (Contoli *et al.*, 2006). Il a été notamment montré que les IFN- λ 1 et - λ 2, plus que l'IFN- λ 3 sont capables d'inhiber *in vitro* le HCV (Diegelmann *et al.*, 2009; Friborg *et al.*, 2013; Kohli *et al.*, 2012; Marcello *et al.*, 2006; Robek *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2012). En plus d'inhiber la réplication du HCV, les IFN- λ s diminuent l'expression de mir122, contribuant d'autant plus à l'inhibition de la réplication virale (Lee *et al.*, 2014a).

En contrepartie, les virus ont développé des moyens de contrer les IFN- λ s. Ainsi, le virus de la maladie de type Yaba (*Yaba-like Disease Virus*), un virus de la famille des

Poxviridae infectant les singes, sécrète une glycoprotéine, Y136, capable de bloquer la voie de signalisation induite par les IFNs de type I et III (Huang *et al.*, 2007b).

c- Les polymorphismes de l'*IL28B* et de l'*IFNL4*

i) Polymorphisme de l'*IFNL4*

De manière intéressante il a été montré que la clairance spontanée de l'infection par le HCV et la réponse au traitement était corrélée aux polymorphismes de l'*IL28B* (ou *IFNL3*) et de l'*IFNL4* (Ge *et al.*, 2009; Knapp *et al.*, 2011; Prokunina-Olsson *et al.*, 2013; Rauch *et al.*, 2010; Suppiah *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2010). Ainsi, l'étude de cohortes de patients hautement exposés mais non infectés, notamment des toxicomanes, a permis d'étudier le lien entre les polymorphismes de l'*IL28B* et de l'*IFNL4* et la clairance du virus. Ainsi, dans le cadre de l'étude de Knapp et collaborateurs, les patients avaient un passif de 8,6 ans en moyenne d'utilisation de drogues par voie intraveineuse et une médiane de 4927 injections (Knapp *et al.*, 2011).

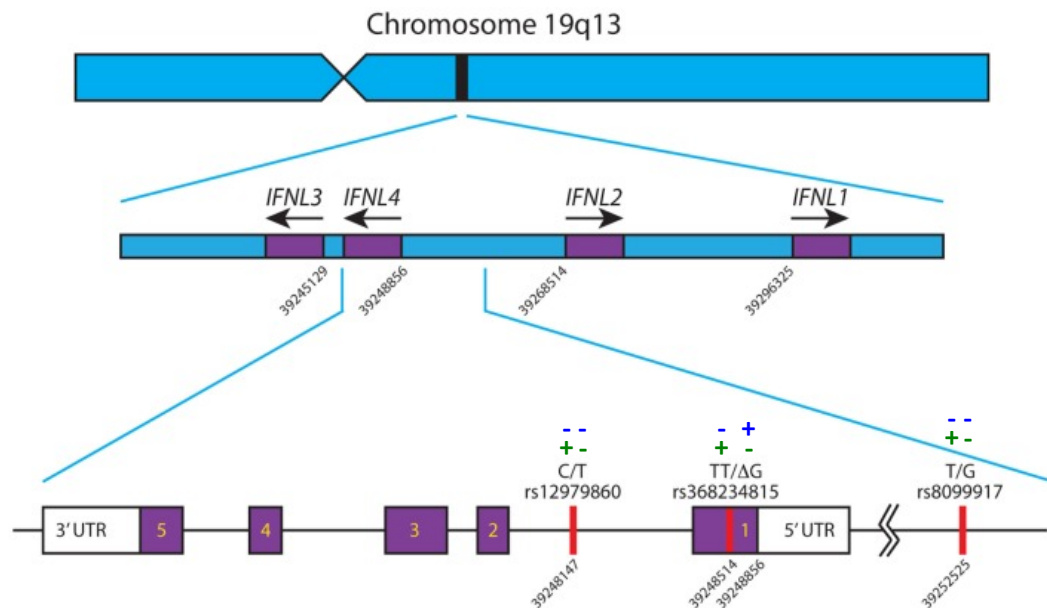


Figure 25 : Polymorphisme de l'IFNL4.

Le gène *IFNL4*, comme les autres gènes codant les IFN- λ s, est situé au niveau du chromosome 19q13. L'*IFNL4* possède 5 exons (indiqués en violet) et des régions 3' et 5' non traduites. Les trois variants nucléotidiques impliqués dans la prédiction de la clairance naturelle au HCV ainsi qu'à la réponse au traitement sont indiqués en rouge. Les positions des premiers nucléotides de chaque exon ainsi que la position des substitutions et délétions de nucléotides sont indiquées. La production (+/-) d'IFNL4 par les différents allèles est indiquée en bleu. La réponse au traitement (+/-) est indiquée en vert. (Laidlaw & Dustin, 2013).

Pendant longtemps certains polymorphismes de l'*IFNL4* étaient attribués à tort à l'*IL28B*. En effet, l'*IFNL4* a été découvert seulement en 2013 par Prokunina-Olsson et collaborateurs (Prokunina-Olsson *et al.*, 2013) et le variant rs1297860 (génotypes C ou T) que l'on pensait concerner l'*IL28B* concernait en réalité un autre gène, l'*IFNL4*.

L'allèle C du variant rs1297860 corrèle avec une meilleure réponse au traitement (Ge *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009). Les deux allèles C et T ne permettent pas l'expression d'*IFNL4*. Le variant rs368234815 (génotypes TT et Δ G) est celui qui a permis d'identifier l'*IFNL4*. En effet, l'expression de ce gène correspond à un décalage du cadre de lecture. Ainsi l'allèle Δ G, conduisant à une délétion, est le seul à conduire à l'expression d'*IFNL4* et est associé à une moins bonne réponse au traitement ainsi qu'à une clairance du virus moins efficace (Bibert *et al.*, 2013; Prokunina-Olsson *et al.*, 2013; Real *et al.*, 2013). Suivant les populations considérées, les degrés de déséquilibre de liaison entre les variants rs1297860 et rs368234815 sont différents, ce qui rend plus complexe l'utilisation de l'un ou l'autre de ces variants comme facteur de prédiction de

réponse au traitement (Aka *et al.*, 2014; Prokunina-Olsson *et al.*, 2013). Enfin, le variant rs8099917 (génotypes T et G) dans la région 5' non codante d'*IFNL4* a également été décrit. L'allèle T est associé à une meilleure réponse au traitement et à la clairance naturelle du virus (Ge *et al.*, 2009; Suppiah *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009) (**Figure 25**).

ii) Polymorphisme de l'*IL28B*

Un polymorphisme de l'*IL28b*, rs8103142 (génotypes T/C ; K70R) situé dans le deuxième exon de l'*IFNL3* a également été décrit. L'allèle T → K70 est ainsi associé à une meilleure réponse au traitement alors que l'allèle C → R70 est associé à une moins bonne réponse au traitement (di Iulio *et al.*, 2011). Cependant, cette tendance reste controversée et des études *in vitro* n'ont pas montré de différences dans l'induction des ISGs par l'IFN-λ3 muté et dans la réplication virale (Urban *et al.*, 2010).

iii) Mécanismes moléculaires

Le mécanisme moléculaire de l'effet conféré par ces polymorphismes sur la clairance naturelle du virus et une meilleure réponse au traitement n'est pas encore connu. Certaines de ces mutations affectent les niveaux d'expression d'IFN-λs, suggérant que ces mutations se situent dans une zone de régulation de la transcription du gène. C'est le cas de l'allèle G du variant rs8099917 qui est lié à une expression plus faible d'IFN-λs dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC pour *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de patients infectés, ainsi que dans les cellules sanguines de patients non infectés (Suppiah *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009). Cependant ces observations restent controversées. De façon similaire, l'allèle protecteur C du variant rs1297860 semble quant à lui être associé à une expression plus élevée d'IFN-λs (Langhans *et al.*, 2010). Mais cette différence d'expression pourrait être due au déséquilibre de liaison qui existe entre ce variant et le variant rs368234815. En effet, l'allèle ΔG est associé à une expression plus faible de l'*IFNL3* (Bibert *et al.*, 2013).

Il est également suggéré que les polymorphismes observés pouvaient être liés à l'échappement ou non à des microARN induits par le HCV et ciblant la région 3' UTR de l'*IL28B*. Ces microARN pourraient en effet affecter la stabilité des transcrits de l'*IL28B* (McFarland *et al.*, 2011).

De manière surprenante, l'expression de l'*IFNL4* est associée à une clairance plus faible du virus alors que la protéine IFN- λ 4 est fonctionnelle et permet bien l'induction d'ISGs. Il a été proposé que la N-glycosylation partielle de la protéine pourrait empêcher sa sécrétion et entraîner son accumulation intracellulaire. L'existence potentielle d'un récepteur intracellulaire affectant la sécrétion est également possible (Hamming *et al.*, 2013; O'Brien *et al.*, 2014).

Par ailleurs, les IFN- λ s sont régulés par l'IFN- α (Ank *et al.*, 2006). Ainsi, ceci pourrait en partie expliquer le lien entre les polymorphismes de l'*IL28B* et de l'*IFNL4* et la réponse au traitement.

d- Autres polymorphismes dans les gènes de la réponse IFNs

Si les polymorphismes des IFN- λ s sont actuellement les meilleurs prédicateurs de la réponse au traitement, des polymorphismes dans d'autres gènes de la voie des IFNs ont été décrits. Ainsi, le récepteur TLR7, capable notamment de reconnaître de l'ARN viral simple brin et d'induire la sécrétion d'IFN- α , présente deux variants dans sa séquence codante qui ont été associés à une évolution vers la chronicité et à une moins bonne réponse au traitement (Schott *et al.*, 2007).

Des polymorphismes dans les ISGs ont également été étudiés. Ainsi, un variant dans la région 3'UTR de OAS-1, un variant dans le promoteur de PKR et un variant dans la région codante de IRF-1 sont associés à la résolution spontanée de l'infection (Knapp *et al.*, 2003; Wietzke-Braun *et al.*, 2006). Un variant dans la région promotrice de MxA a été décrit mais reste controversé (Knapp *et al.*, 2003; Wietzke-Braun *et al.*, 2006).

2- Cellules NK

a- Expression de NKp30

La réponse immunitaire via l'activité des cellules NK a aussi été associée aux patients exposés mais non infectés par le HCV, aussi bien pour les utilisateurs de drogues par voie intraveineuse (UDIV) (Golden-Mason *et al.*, 2010; Pelletier *et al.*, 2010) que pour les personnels de soins et les enfants nés de mère infectée (Hurtado *et al.*, 2009; Werner *et al.*, 2013). Ainsi, une plus grande fréquence de NKp30 (ou NCR3 pour *Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 3*) a été observée chez les patients exposés non

infectés par comparaison avec les patients infectés (Golden-Mason *et al.*, 2010). Or, NKp30 permet l'activation des DCs par les cellules NK, permettant de renforcer la production de cytokines qui induisent la prolifération de cellules NK activées. Egalement, des cellules NK exprimant des niveaux importants de NKp30 mises en co-culture avec des cellules hépatocytaires exprimant un réplicon du HCV suffisent à inhiber l'infection comparées à des cellules NK exprimant un niveau faible de NKp30. Ceci suggère une meilleure dégranulation des cellules NK exprimant NKp30 (Golden-Mason *et al.*, 2010).

Les cellules NK sont divisées en trois sous-groupes, les cellules NK CD56^{bright}CD16⁻, les cellules NK CD56^{dim}CD16⁺ et les cellules NK CD56^{dull}CD16⁺. Les deux premières populations sont impliquées dans la production de grandes quantités de cytokine et en particulier d'IFN- γ et dans la cytotoxicité cellulaire respectivement. La dernière population est encore peu connue et pourrait avoir une activité cytotoxique. En revanche elle produit peu de cytokines. Le groupe de Sugden et collaborateurs a montré une population plus importante de cellules NK CD56^{bright}NKp30⁺ ainsi qu'une expression plus fréquente sur les autres populations de cellules NK de NKp30 chez les patients exposés non infectés. Ils ont également observé une expression plus importante de CD69, un marqueur d'activation, dans les cellules NK CD56^{dim}CD16⁺. La production d'IFN- γ était également plus importante dans un certain nombre de populations de cellules NK, en particulier les CD56^{bright} (Sugden *et al.*, 2014).

De manière intéressante, cette augmentation de l'expression de NKp30 a également été observée chez des patients présentant une réponse soutenue au traitement, alors que ce n'est pas le cas chez les patients non répondeurs (Bozzano *et al.*, 2011).

b- Récepteurs KIRs et système HLA

L'activité des cellules NK est régulée par un certain nombre de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Parmi ces récepteurs, la famille de récepteurs KIRs représente un groupe particulièrement important et diversifié. Ces récepteurs sont transmis génétiquement sous forme d'haplotypes, entraînant une grande diversité d'une personne à l'autre des récepteurs KIRs qu'elles expriment (**Figure 26**).

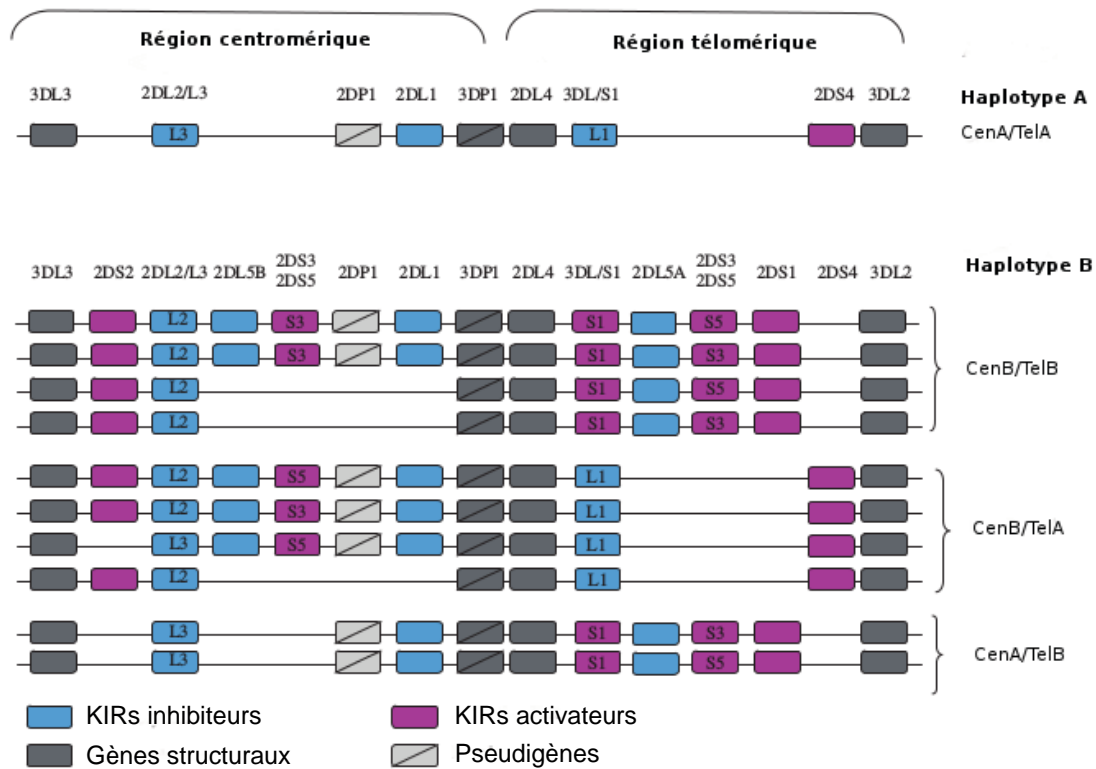


Figure 26 : Haplotypes des récepteurs KIRs.

Les gènes structuraux sont présents dans tous les haplotypes. Ils délimitent les régions centromériques et télomériques. Il existe deux haplotypes (A et B), le premier contenant un nombre de récepteurs constant alors que le second a une composition très variable (D'après Falco *et al.*, 2013).

Les récepteurs KIRs sont dénommés en fonction de leur nombre de domaines extracellulaires (2D ou 3D) et en fonction de la taille de la queue cytoplasmique (L pour *Long* et S pour *Short*) (Marsh *et al.*, 2003). Les queues cytoplasmiques longues sont associées à une activité inhibitrice via un motif ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) qui se phosphoryle suite à la reconnaissance d'un ligand et interrompt la réponse des cellules NK. Les récepteurs à queues courtes en revanche ne possèdent pas ce motif mais un acide aminé chargé au niveau de leur domaine transmembranaire. Cet acide aminé permet une interaction avec la protéine DAP12 qui possède quant à elle un motif ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif*) (Colonna, 1997; Lanier *et al.*, 1998; Long, 1998; Moretta *et al.*, 1994; 2001) (**Figure 27**).

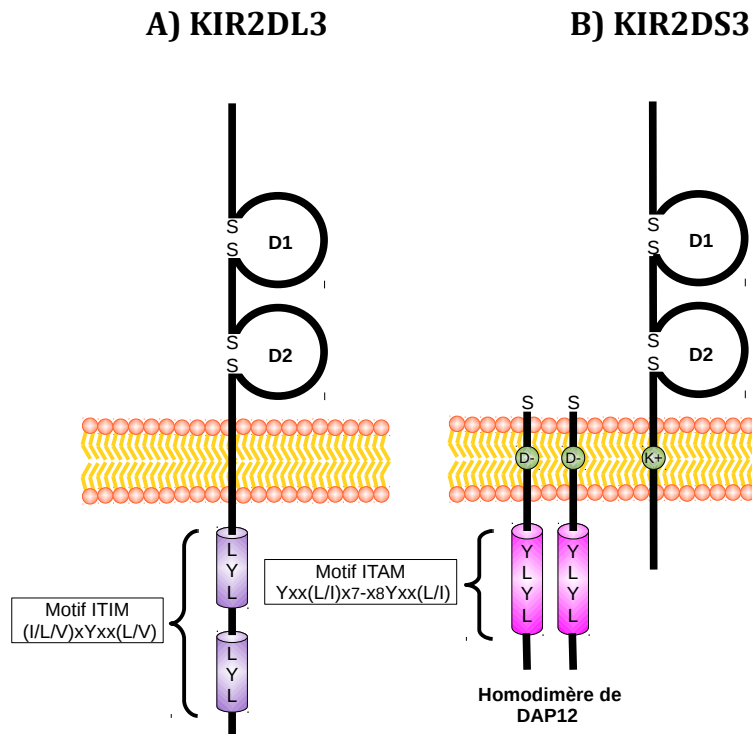


Figure 27 : Organisation moléculaire des récepteurs KIRs.

Les récepteurs KIRs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et peuvent posséder entre 2 et 3 domaines extracellulaires. On dénombre deux types de récepteurs. **A)** Les récepteurs inhibiteurs, dont KIR2DL3 est représentatif, sont caractérisés par une queue cytoplasmique longue portant un domaine ITIM. **B)** Les récepteurs activateurs, dont KIR2DS3 est représentatif, sont caractérisés par une queue cytoplasmique courte et un acide aminé chargé positivement au niveau du domaine transmembranaire. Cet acide aminé chargé permet l'interaction avec un homodimère de la protéine DAP12 qui porte un domaine ITAM au niveau de sa queue cytoplasmique.

Les récepteurs KIRs reconnaissent de façon spécifique des antigènes HLA. Ainsi les HLA-C1 interagissent avec les récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3 et les HLA-Bw4 sont les ligands des récepteurs KIR3DL1 (**Figure 28**).

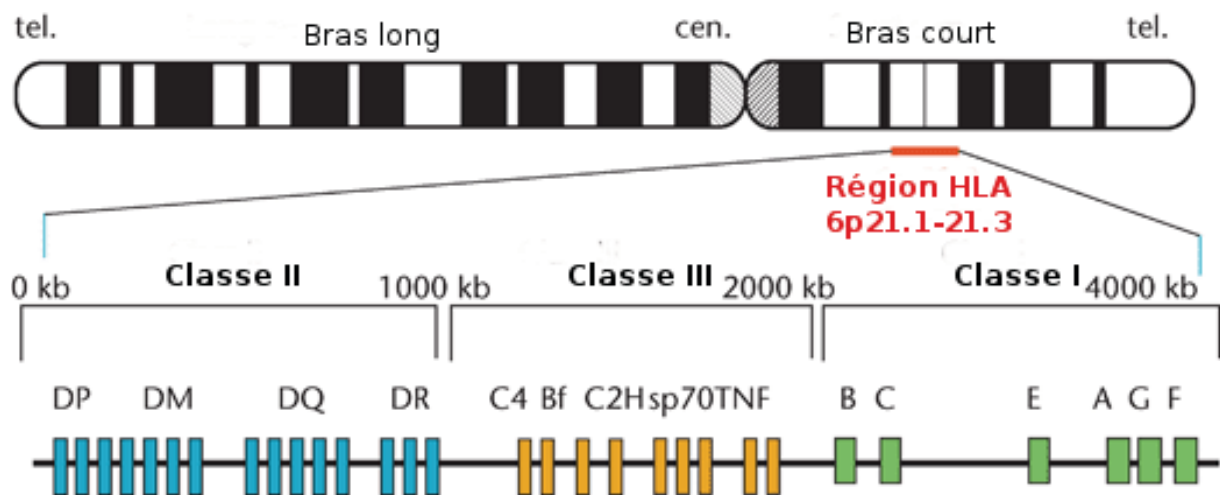


Figure 28 : Carte génétique des antigènes de leucocytes humains (HLA).

Les HLA de classe I présentent des antigènes endogènes et permettent une présentation notamment aux cellules NK et aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺. Les HLA de classe II permettent la présentation d'antigènes présents dans le milieu extracellulaire notamment aux lymphocytes T CD4⁺. Enfin, les HLA de classe III codent des protéines appartenant au système du complément (D'après Mehra & Kaur, 2003).

De manière intéressante, il a été observé que chez des patients exposés ayant spontanément guéri d'une infection par le HCV, la fréquence de l'allèle *HLA-C1* était plus importante que chez les patients infectés. L'association avec la guérison spontanée était significative pour les patients homozygotes pour l'allèle *KIR2DL3*, codant le récepteur de HLA-C1. Par ailleurs, l'affinité de l'interaction de HLA-C1 avec *KIR2DL3* est plus faible que l'interaction avec *KIR2DL2*, ce qui, de part un seuil plus élevé d'activation de l'action inhibitrice de *KIR2DL3*, pourrait expliquer le lien avec une meilleure clairance du virus via une moins bonne inhibition de l'activité des cellules NK. Il est important de noter que l'effet protecteur de cette combinaison d'allèles n'est observé que pour les patients UDIV, ayant été exposés à de faibles doses de HCV (Khakoo *et al.*, 2004). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études (Knapp *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2008). Egalement, cette combinaison est associée à une meilleure réponse au traitement (Knapp *et al.*, 2010). Cependant, aucune corrélation n'a été observée par Sugden et collaborateurs (Sugden *et al.*, 2014).

En revanche, le gène *KIR2DS3*, codant un récepteur au HLA-C2 est quant à lui corrélé à une infection chronique par le HCV (Dring *et al.*, 2011). Ceci est en accord avec d'autres études menées sur d'autres virus ayant identifié *KIR2DS3* comme étant associé à un mauvais pronostic dans d'autres infection virales. C'est ainsi le cas pour le virus

Ebola (Wauquier *et al.*, 2010), le virus de la dengue (Beltrame *et al.*, 2013) ou encore le virus de l'hépatite B (Zhi-ming *et al.*, 2007).

3- Réponse aux lymphocytes T

a- Production d'IFN- γ

La clairance spontanée du HCV a également été associée à une production d'IFN- γ par des lymphocytes T ainsi qu'à une production importante d'IL-2 (Smyk-Pearson *et al.*, 2008). Cette production plus importante d'IFN- γ est observée lorsque l'on prélève des PBMCs sur des patients non infectés ayant été particulièrement exposés au HCV. Lorsque ces PBMCs sont mis en présence de protéines non structurales du HCV, une production plus importante d'IFN- γ est observée comparée aux patients non infectés contrôle et aux patients chroniquement infectés (Cameron *et al.*, 2013; Freeman *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2006; Mizukoshi *et al.*, 2008; Neveu *et al.*, 2008; Thurairajah *et al.*, 2008; Zeremski *et al.*, 2009). Il a ainsi été montré que jusqu'à 94% des patients exposés non infectés avait une réponse des lymphocytes T avec production d'IFN- γ contre 45% pour les patients effectivement infectés (Mizukoshi *et al.*, 2008). Il ne peut pas être exclu que les patients considérés comme non infectés aient en réalité été exposés à de faibles doses de HCV éliminée naturellement par le système immunitaire sans qu'il y ait séroconversion, leur conférant une protection pendant leur période de toxicomanie (Elliott *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2007). Cette hypothèse a en effet été vérifiée *in vivo* sur des chimpanzés exposés à de faibles doses de HCV (Shata *et al.*, 2003). De plus, un mécanisme similaire a été décrit notamment chez les prostituées qui sont particulièrement à risque pour une contamination par le HIV. Il a été ainsi montré qu'après un arrêt de l'activité et une reprise de l'activité plus tard, ces prostituées pouvaient être infectées par le HIV alors qu'avant elles semblaient en être protégées (Kaul *et al.*, 2001). Il ne peut pas être exclu non plus que la réaction observée lorsque les PBMCs sont exposés à des antigènes du HCV puisse être due à une réactivité croisée avec d'autres antigènes. En effet, il a été montré qu'il existait une réactivité croisée entre des antigènes de l'influenza A et des antigènes du HCV au niveau des lymphocytes T cytotoxiques (Wedemeyer *et al.*, 2001).

b- Système HLA

Parallèlement à ce qui a été observé pour les cellules NK avec les récepteurs KIRs et les HLA de classe I, certains allèles des HLA de classe II, reconnus par les lymphocytes T CD4+, ont été associés à une clairance spontanée du virus chez des patients UDIV ou bien ayant été transfusés. Ainsi, le polymorphisme des HLA de classe II est susceptible de modifier l'activité des lymphocytes T. C'est le cas de certains allèles de HLA-DRB1 (Barrett *et al.*, 1999; Cramp *et al.*, 1998; Fanning *et al.*, 2000; Mangia *et al.*, 1999; McKiernan *et al.*, 2000; 2004; Romero *et al.*, 2008; Thio *et al.*, 2001; Thursz *et al.*, 1999), de HLA-DQA1 (Cramp *et al.*, 1998; Zavaglia *et al.*, 1998), de HLA-DQB1 (Cramp *et al.*, 1998; Thio *et al.*, 2001) ou encore de la combinaison de certains allèles de HLA-DRB1 et de HLA-DQB1 (Alric *et al.*, 1997; Mangia *et al.*, 1999; Minton *et al.*, 1998; Thursz *et al.*, 1999; Zavaglia *et al.*, 1998).

Par ailleurs, la molécule non classique HLA-E a également été associée à un phénotype protecteur contre le HCV. Cette molécule présente uniquement deux variants à ce jour où une arginine remplace une glycine à la position 107 (Strong *et al.*, 2003). De manière intéressante il a été montré qu'une forte expression de HLA-E corrélait avec un état chronique de l'infection par HCV via un peptide de la protéine core qui stabiliserait l'expression de HLA-E. Cette molécule est un ligand du récepteur inhibiteur des cellules NK CD94:NKG2A (Nattermann *et al.*, 2005). Or, l'allèle HLA-E^R est associé à une infection non chronique par le HCV. Schulte et collaborateurs ont suggéré que cet allèle empêcherait la reconnaissance du peptide de la protéine core impliqué dans la chronicité par les lymphocytes T CD8+ (Schulte *et al.*, 2009). Il ne peut cependant pas être exclu que l'effet protecteur soit dû à une affinité différente de l'allèle HLA-E^R pour son récepteur sur les cellules NK.

Il a été suggéré que certains allèles des HLAs associés à un phénotype protecteur face au HCV pouvaient favoriser une immunisation contre des épitopes des protéines virales particulièrement conservés et pour lesquels des mutations seraient délétères pour le virus (Dazert *et al.*, 2009).

c- Polymorphismes des cytokines produites par les lymphocytes T

En plus de l'importance de l'activité des lymphocytes T dans la prédiction de l'évolution de la maladie et la réponse au traitement, un certain nombre de polymorphismes dans les gènes codant des cytokines produites entre autre par différentes populations de lymphocytes T semblent également être importants dans cette prédiction. Des polymorphismes dans les gènes codant les IL-10, -12 et -22 ont été associés à la clairance du virus et à la protection face à la contamination par ce dernier (Hennig *et al.*, 2007; Houldsworth *et al.*, 2005; Knapp *et al.*, 2003). Des variants de l'IFN- γ (Huang *et al.*, 2007c), de TNF- α (Lio *et al.*, 2003) et TGF- β (Kimura *et al.*, 2006) ont aussi été associés à la clairance du HCV.

C- Facteurs cellulaires

1- Polymorphisme de la cyclophiline A

La CypA, une protéine ayant une activité peptidyl-prolyle isomérase, est impliquée dans la réplication et potentiellement l'assemblage du HCV (Chatterji *et al.*, 2010a; Kaul *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009b). Six variants codants donnant lieu à des substitutions d'acides aminés ont été décrits pour ce gène. De manière intéressante parmi ces variants, trois sont capables de bloquer la réplication du HCV *in vitro*. Ainsi, les mutations ponctuelles D66E, G96D, et N106I dans la CypA réduisent de façon drastique la réplication virale. Il semblerait que l'inhibition de la réplication virale par ces variants soit due à un défaut de stabilité de ces derniers (von Hahn *et al.*, 2012).

2- Polymorphisme de CD81

Contrairement au HIV, pour lequel une mutation dans un cofacteur d'entrée, CCR5, CCR5 Δ 32, suffit à empêcher l'infection virale (Samson *et al.*, 1996), à ce jour aucune mutation dans un des facteurs d'entrée du HCV n'a été identifiée. Sept variants ont été décrits dans la séquence codante de CD81. Six de ces variants sont dans la LEL et un dans le quatrième segment transmembranaire. L'étude *in vitro* de ces variants n'a pas permis de mettre en évidence un quelconque effet sur l'infection par les HCVpp et HCVcc (Deest *et al.*, 2014). Une étude avait également séquencé CD81 sur une cohorte de

patients exposés mais non infectés et de patients infectés mais n'avait observé aucune différence dans les séquences (Houldsworth *et al.*, 2014).

3- Polymorphisme de CLDN-1, OCLN et LDL-R

Les polymorphismes d'autres facteurs d'entrée ont également été étudiés afin de connaître leur impact sur la susceptibilité à l'infection par le HCV et la clairance de l'infection. Cependant, à l'heure actuelle, il n'y a que peu de données en faveur d'un polymorphisme qui protégerait de l'infection ou favoriserait sa résolution. Une étude réalisée sur des patients UDIV aux Etats-Unis a suggéré, sur 50 variants de CLDN-1, que trois d'entre eux, 15312C, 5414C et 7153A, constitutifs d'un haplotype et situés dans le promoteur du gène, étaient plus présents chez les patients exposés non infectés. *A contrario*, le variant IVS1-2983C situé dans le premier intron était moins présent dans cette population. En revanche aucun variant n'a été associé à la clairance du virus (Bekker *et al.*, 2010).

Deux études ont également décrit des variants dans LDL-R associés à une meilleure clairance du virus ainsi qu'à une meilleure réponse au traitement. Ainsi la transition silencieuse G→A à la position 13397 dans l'exon 10 de LDL-R est associée à une meilleure clairance tandis que la transition A→G à la position 31125 dans la région 3'-UTR est associée à une meilleure réponse au traitement (Hennig *et al.*, 2002). Cette dernière corrélation n'a toutefois pas été confirmée dans une étude ultérieure où le contraire a été observé (Mas Marques *et al.*, 2009). Par ailleurs, une étude menée en Allemagne sur une cohorte de patientes ayant été toutes contaminées par le HCV via le même lot d'immunoglobulines anti-D, utilisées essentiellement chez les femmes venant d'accoucher pour éviter la maladie hémolytique du nouveau né, s'est intéressée à l'impact du polymorphisme de certains facteurs d'entrée sur la sélection de différents variants viraux. En effet, le lot d'Ig-anti-D était contaminé par plusieurs variants viraux. Cependant, aucune corrélation entre les variants présents chez les patientes et les allèles de CLDN-1, OCLN et LDL-R pris en compte dans l'étude n'a pu être établi. Cette étude, réalisée sur une population plus homogène et exposée à un même inoculum de HCV, renforce l'idée que ces différents polymorphismes n'affectent pas la susceptibilité à l'infection par le HCV (Lipskoch *et al.*, 2014).

D- Autres facteurs

Des résultats contradictoires sont régulièrement observés d'une étude à l'autre lorsque l'on considère les facteurs génétiques susceptibles d'affecter l'évolution de l'infection ou la réponse au traitement. Ceci peut s'expliquer par des différences ethniques selon les cohortes étudiées. Ainsi, des résultats opposés sont observés dans les populations d'origine caucasienne ou non, concernant l'association entre des allèles de HLA-A et DRB1 et l'infection par le HCV (Wang *et al.*, 2008). D'autres facteurs entrent en compte, tel que le sexe, l'âge ou encore la consommation d'alcool. Ainsi être une femme, jeune et ne pas consommer d'alcool sont des éléments en faveur d'une clairance spontanée du virus (Piasecki *et al.*, 2004; Wietzke-Braun *et al.*, 2007). Egalement, développer une réponse symptomatique aiguë lors de l'infection par le HCV ainsi qu'une charge virale faible au moment de l'infection sont favorables à l'élimination spontanée du virus (Alric *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2006). Enfin, des taux élevés de triglycérides semblent être un facteur en faveur de la clairance du HCV (Marzouk *et al.*, 2007)

VII- LES TETRASPANINES

A- La superfamille des tétraspanines

1- Généralités

Les tétraspanines forment une superfamille de protéines découvertes à la fin des années 1980 (Oren *et al.*, 1990) et possédant, comme leur nom l'indique, quatre domaines transmembranaires. On connaît 33 tétraspanines chez l'Homme (**Figure 29**), mais on en retrouve aussi bien chez des insectes, des champignons, des cnidaires, des amibes, certains protozoaires et des nématodes (Huang *et al.*, 2005). Il existe également des protéines proches des tétraspanines chez les plantes. Les tétraspanines sont caractérisées par la présence de quatre résidus cystéines conservés, dont deux font partie d'un motif CCG conservé au niveau de la grande boucle extracellulaire (LEL). Elles possèdent également des résidus polaires conservés au sein des domaines transmembranaires. Ce sont de petites protéines comprises entre 204 et 355 acides aminés. Elles sont présentes à la surface de presque toutes les cellules et seraient les protéines les plus abondantes de la membrane plasmique. Les tétraspanines ont la propriété de former des réseaux, le *tetraspanin web*, en s'associant entre elles ainsi qu'avec d'autres protéines et certains lipides. La proximité de séquences entre les différents gènes des tétraspanines suggère qu'elles dérivent d'un gène ancestral après plusieurs épisodes de duplication successifs. En effet, les tétraspanines sont retrouvées sur plusieurs chromosomes au sein d'une même espèce (Huang *et al.*, 2010).

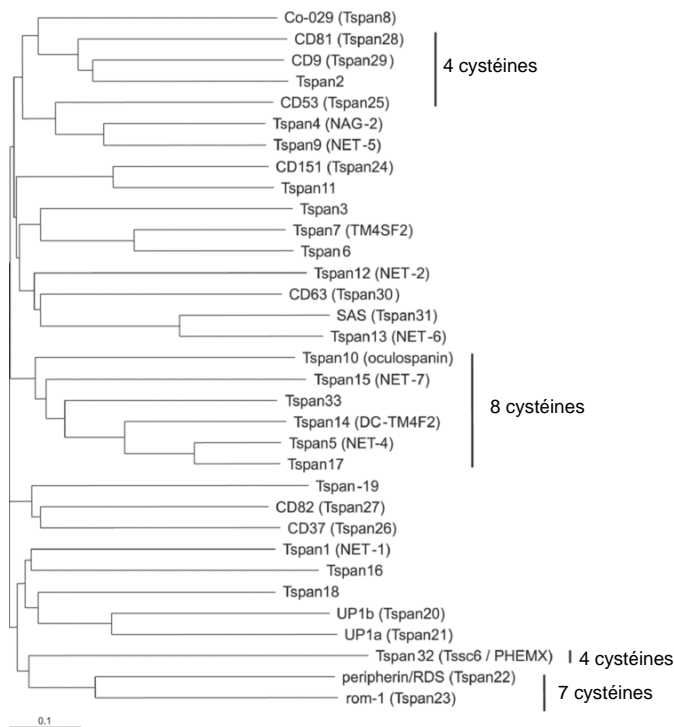


Figure 29 : Arbre phylogénétique des tétraspanines.

Les tétraspanines sont caractérisées par la présence de cystéines dans la LEL, dont 4 sont présentes chez toutes les tétraspanines. La plupart des tétraspanines possèdent 6 cystéines dans leur LEL. Les tétraspanines en possédant un nombre différent sont indiquées (D'après Charrin *et al.*, 2009).

Les tétraspanines sont divisées en trois familles. Tout d'abord on distingue la famille des CD, à laquelle des tétraspanines comme CD81, CD9, ou CD151 appartiennent. CD63 représente à elle seule, chez l'Homme, une famille de tétraspanine. Enfin, deux autres familles de tétraspanines ont été définies, la famille des uroplakines et la famille des tétraspanines rétiniennes RDS.

Les tétraspanines étant un sujet très vaste, seules les tétraspanines se rapportant à mon sujet de thèse, c'est-à-dire CD81, CD151, CD82, CD9, CD63 et Tspan8, seront décrites. Les grandes lignes des fonctions physiologiques des tétraspanines seront abordées mais le rôle des tétraspanines dans les infections virales sera plus développé.

2- Structure des tétraspanines

Les tétraspanines possèdent quatre domaines transmembranaires, TM-1, -2, -3 et -4 et deux boucles extracellulaires, une petite boucle (SEL) et une grande boucle (LEL). Elles possèdent également trois domaines intracellulaires (**Figure 30**).

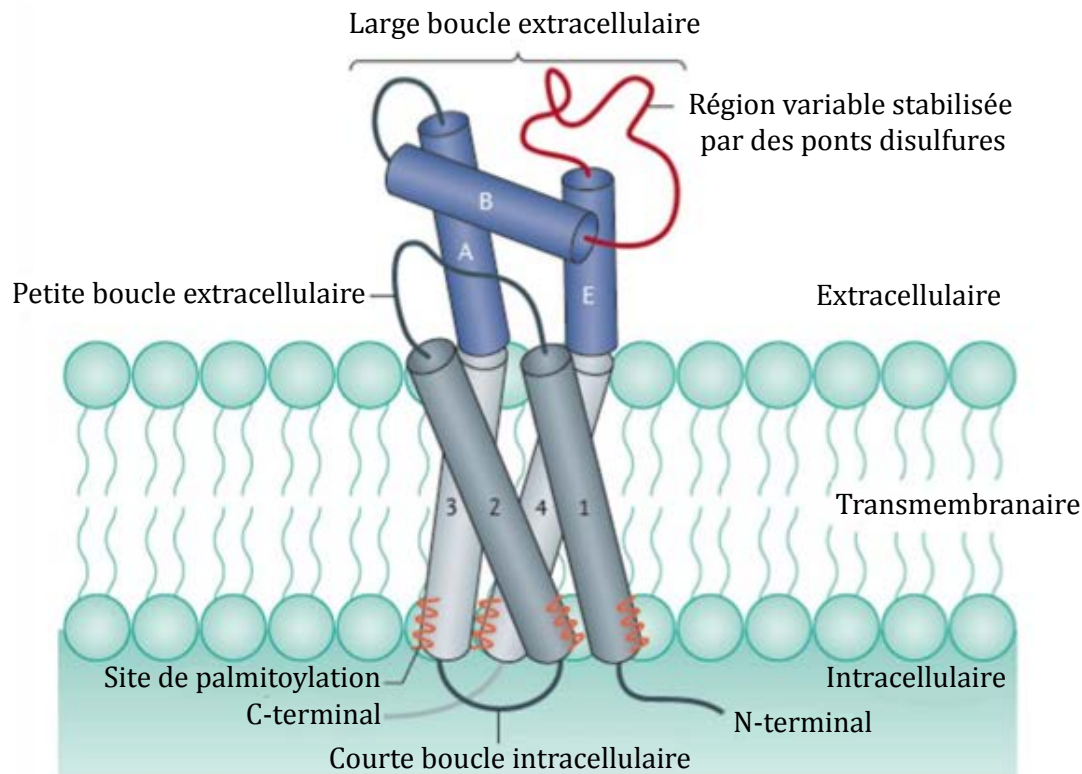


Figure 30 : Organisation structurale des tétraspanines.

Les tétraspanines présentent deux boucles extracellulaires, une petite, SEL et une grande, LEL. La LEL possède une partie conservée formée des hélices A, B et E ainsi qu'une partie variable contenant les domaines C et D. Elles possèdent également quatre domaines transmembranaires et trois domaines cytoplasmiques, ces derniers arborant des cystéines proches de la membrane plasmique qui peuvent être palmitoylées (D'après Hemler, 2014).

a- Les boucles extracellulaires

Comme évoqué précédemment, les tétraspanines possèdent deux domaines extracellulaires de tailles différentes. La LEL est composée d'une région conservée, contenant les hélices A, B et E et d'une région variable, pouvant présenter des structures différentes selon les tétraspanines, située entre les hélices B et E et constituée des domaines C et D. Ces domaines variables sont essentiellement impliqués dans la liaison avec des tétraspanines et d'autres protéines (Seigneuret *et al.*, 2001). L'importance du domaine D dans le maintien de l'organisation du *tetraspanin web* a récemment été mis en évidence dans le cadre de la protéine CD81 (Homsy *et al.*, 2014). La LEL des

tétraspánines présente une structure dite « en champignon », où les hélices A et E forment le pied et les hélices B, C et D la coiffe (Rajesh *et al.*, 2012; Seigneuret, 2006). La LEL contient le motif CCG conservé au niveau de l'hélice B ainsi que les deux autres cystéines conservées, au niveau de l'hélice E et du domaine variable. Ces cystéines participent au repliement de la protéine et stabilisent la structure de la LEL en établissant des ponts disulfures. Par ailleurs, la plupart des sites de N-glycosylation des tétraspánines se situe au niveau de la LEL. Cependant, certaines tétraspánines, comme CD81, ne sont pas glycosylées.

La SEL, quant à elle, présente une taille relativement constante comprise entre 20 et 28 acides aminés. Contrairement à la LEL, les fonctions de la SEL sont beaucoup moins connues. Elle contiendrait un feuillet- β hydrophobe qui pourrait interagir avec la LEL (Seigneuret, 2006). Cette interaction pourrait expliquer le rôle de la SEL dans la stabilisation de la conformation de la LEL (Masciopinto *et al.*, 2000).

b- Les domaines transmembranaires

Les quatre hélices formant les domaines transmembranaires sont très conservées au sein des tétraspánines. Les domaines transmembranaires TM1, TM3 et TM4 contiennent chacun un résidu polaire conservé (Asparagine, Glutamine, Acide glutamique) capable d'établir des liaisons hydrogènes (Gratkowski *et al.*, 2001) et sont impliqués dans la stabilisation de la structure des tétraspánines. Il a ainsi été démontré, en mutant les trois résidus polaires dans les domaines transmembranaires de CD82, que cela abolissait son activité de suppresseur de tumeurs. Cette perte de fonction a été reliée à une déstabilisation de la structure de la protéine (Bari *et al.*, 2009). Les différents domaines transmembranaires sont également impliqués dans les interactions entre les tétraspánines et d'autres protéines comme cela sera détaillé par la suite.

c- Les domaines intracellulaires

En dehors d'une courte boucle entre les TM2 et TM3, les tétraspánines possèdent deux queues N- et C-terminales cytoplasmiques. Ces deux domaines font généralement moins de 20 acides aminés.

Ces domaines intracellulaires peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles. En effet, au niveau des régions intracellulaires sont retrouvés des cystéines, entre 1 et 7, proches des membranes, qui peuvent être palmitoylées (Charrin *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004). Des ubiquitinations ont également été rapportées, notamment dans le cas de CD82 (Tsai *et al.*, 2007) ou de CD151 et CD81, et seraient responsables de l'adressage au protéasome de ces dernières (Lineberry *et al.*, 2008). Récemment, une étude a montré que les tétraspanines pouvaient aussi être phosphorylées, comme cela a été montré pour CD37 (Lapalombella *et al.*, 2012).

Certaines tétraspanines, 12 parmi les 33 connues chez l'Homme, possèdent un motif d'internalisation Yxx ϕ (ϕ correspond à un acide aminé possédant une chaîne latérale hydrophobe) en C-terminal, qui permet la reconnaissance par une protéine AP de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Stipp *et al.*, 2003). Cependant, la fonction réelle de ce motif dans le cadre des tétraspanines reste à déterminer et son utilisation pourrait être différente d'une tétraspanine à l'autre (Rous *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2009).

3- Expression et localisation des tétraspanines

Les tétraspanines sont retrouvées au niveau de toutes les cellules et les cellules expriment généralement plusieurs tétraspanines. Si certaines sont quasi-ubiquitaires, comme CD81 ou CD82, certaines, bien qu'exprimées dans un large panel de cellules, sont plus restreintes. C'est ainsi le cas de CD151, qui est majoritairement exprimée au niveau des cellules endothéliales et épithéliales. Enfin, certaines tétraspanines sont tissu-spécifiques. Ainsi, les uroplakines sont exprimées uniquement au niveau de l'urothélium (Sun *et al.*, 1996), l'épithélium qui tapisse les voies urinaires, et les tétraspanines ROM-1 ainsi que la périphérine/RDS sont exclusivement exprimées au niveau de la rétine (Van Soest *et al.*, 1999).

Si les tétraspanines sont essentiellement exprimées à la surface des cellules, elles sont également retrouvées au niveau de certains compartiments intracellulaires. Ainsi, les exosomes sont particulièrement riches en tétraspanines, notamment CD151, CD37, Tspan8 et CD82 (Rana *et al.*, 2012; Smyth *et al.*, 2013; Yue *et al.*, 2014). CD63 fait figure d'exception au sein des tétraspanines en étant particulièrement présente au niveau des endosomes tardifs et des corps multivésiculaires (Pols & Klumperman, 2009; Rous *et al.*,

2002). De plus, via leur motif d'internalisation ou par d'autres mécanismes à déterminer, d'autres tétraspanines peuvent également se retrouver au niveau des endosomes et des corps multivésiculaires (Escola *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2005; Pelchen-Matthews, 2003).

B- Organisation membranaire des tétraspanines

Les tétraspanines ont la propriété d'interagir avec des protéines dites partenaires, mais également d'interagir entre elles. Les tétraspanines forment alors un réseau, le *tetraspanin web* ou microdomaine enrichi en tétraspanines (TEM). Comme cela sera vu plus en détails, les tétraspanines peuvent également s'associer à certains lipides et former localement des zones enrichies en tétraspanines, les TEAs.

1- Protéines partenaires

Alors que peu de ligands naturels des tétraspanines ont pu être trouvés, ces dernières ont en revanche la propriété de s'associer spécifiquement à certaines protéines. Différentes approches ont permis d'identifier un certain nombre de ces interactions. Ainsi, des expériences de co-immunoprécipitations après lyse des cellules dans des conditions de détergents particulières, des pontages covalents ou encore des techniques poussées de microscopie ont permis de mettre à jour certaines de ces interactions. Les protéines qui interagissent avec les tétraspanines dans des conditions de détergents qui affectent les interactions entre tétraspanines, sont appelées protéines partenaires. Les interactions entre les tétraspanines et leur(s) protéine(s) partenaire(s) constituent les interactions primaires du tetraspanin web.

Il a ainsi été montré que les protéines de la famille des intégrines, des immunoglobulines, des précurseurs de facteurs de croissance ou encore des protéoglycanes, étaient les principales protéines partenaires des tétraspanines (**Tableau 2**).

Tétraspanine	Protéine partenaire
CD81	$\alpha 4\beta 1$ (Serru <i>et al.</i> , 1999)
	CD19 (Horvath <i>et al.</i> , 1998)
	EWI-2 (Stipp <i>et al.</i> , 2001)
	EWI-F (Stipp <i>et al.</i> , 2001)
	CLDN-1 (Kovalenko <i>et al.</i> , 2007)
CD63	CXCR4 (Yoshida <i>et al.</i> , 2008)
	H ⁺ K ⁺ ATPase (Duffield <i>et al.</i> , 2003)
	Synapotagmine VII (Flannery <i>et al.</i> , 2010)
CD151	$\alpha 3\beta 1$ (Yauch <i>et al.</i> , 1998a)
	$\alpha 6\beta 1$ (Serru <i>et al.</i> , 1999)
	$\alpha 6\beta 4$ (Sterk <i>et al.</i> , 2000)
	$\alpha_{11b}\beta 3$ (Lau, 2004)
	MT1-MMP (Yáñez-Mó <i>et al.</i> , 2008)
	VCAM-1 (Barreiro, 2005)
CD9	Pro-HB-EGF (Iwamoto, 1994)
	EWI-2 (Stipp <i>et al.</i> , 2001)
	EWI-F (Stipp <i>et al.</i> , 2001)
	EpCAM (Le Naour <i>et al.</i> , 2006b)
	CLDN-1 (Kovalenko <i>et al.</i> , 2007)
	ICAM-1 (Barreiro, 2005)
	$\alpha 2\beta 1$ (Cailleteau <i>et al.</i> , 2010)
	Pro-TGF- α (Shi, 2000)
Tspan8	E-cadherine (Greco <i>et al.</i> , 2010)

Tableau 2 : Exemples de protéines partenaires de tétraspanines.

La plupart de ces interactions s'établit via la LEL des tétraspanines, comme c'est le cas de l'interaction entre CD151 et ses différentes intégrines partenaires (Berditchevski *et al.*, 2001; Kazarov, 2002; Yauch, 2000). Il a cependant été montré que les domaines transmembranaires pouvaient être impliqués dans ces interactions, comme c'est le cas pour les uroplakines (Min, 2006).

En dehors de ces interactions directes, les tétraspanines interagissent avec de nombreuses autres protéines. C'est ainsi le cas de l'association entre CD82 et EGF-R, une interaction qui est détectée en utilisant des détergents doux (Odintsova *et al.*, 2000) ou encore de l'association entre CD9 et EGF-R (Murayama *et al.*, 2008).

2- Tetraspanin web ou TEMs

Les tétraspanines ont également la propriété d'établir entre elles des interactions secondaires. Ces interactions seraient médiées en partie par la palmitoylation des cystéines juxtamembranaires des domaines intracellulaires (Berditchevski, 2002; Charrin *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2004; Yang, 2004). Des études ont montré que les tétraspanines pour lesquelles suffisamment de sites de palmitoylation étaient mutés, perdaient leur faculté à se lier à d'autres tétraspanines. Cela a notamment été montré dans le cas de CD9, qui n'interagit plus avec CD81 dans certaines conditions (Charrin *et al.*, 2002). De façon similaire, la mutation des sites de palmitoylation de CD151 affecte son interaction avec CD9 et CD63 (Berditchevski, 2002; Yang *et al.*, 2002). De même, la mutagenèse CD81, provoque la perte d'interaction avec CD151 et CD9 (Delandre *et al.*, 2009; Montpellier *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012).

La discrimination entre les interactions secondaires des tétraspanines et les interactions primaires qu'elles forment avec leurs partenaires est en particulier observable en utilisant différentes conditions de détergents. Ainsi, l'utilisation de Triton X-100 ou de NP40 dissocie l'ensemble des interactions au sein des TEMs. Par contre, l'utilisation de détergents plus doux tels que le Brij97 ou le CHAPS permet de préserver les interactions tétraspanine/tétraspanine. L'utilisation de digitonine ou l'ajout d'EDTA aux détergents doux désorganise les interactions secondaires mais préserve les interactions tétraspanine/protéine partenaire.

Les TEMs ont été rapprochés à des radeaux lipidiques car ils en partagent certaines propriétés. En effet, les TEMs possèdent des propriétés communes aux membranes résistantes aux détergents (DRM) et, après lyse et ultracentrifugation sur gradient de sucrose, présentent une faible densité similaire à celle des radeaux lipidiques (Berditchevski, 2002; Charrin *et al.*, 2002; Claas *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2004). De plus, les tétraspanines peuvent s'associer à différents lipides, notamment les gangliosides (Claas *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2004; Odintsova *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2001). Il a en effet été montré que CD9 pouvait interagir directement avec GM3 (Ono *et al.*, 2001) et que les gangliosides étaient essentiels au maintien de l'intégrité des domaines enrichis en CD82 (Odintsova *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que les tétraspanines interagissaient avec le cholestérol, comme cela a été décrit en utilisant de la digitonine, une molécule capable de précipiter le cholestérol, et qui co-précipite les

tétraspanines (Charrin *et al.*, 2003). Les radeaux lipidiques sont en effet caractérisés par leur résistance aux détergents ainsi que par un enrichissement spécifique en certains lipides (notamment des sphingolipides, du cholestérol et des phospholipides) et la présence de certaines protéines, notamment des protéines à ancrage GPI et de la cavéoline (Brown et London, 1998). Cependant, ces protéines sont absentes des TEMs (Le Naour *et al.*, 2006a). De plus, à l'inverse des TEMs, les radeaux lipidiques sont résistants à un traitement avec 1% de Triton X-100 et sensibles à un traitement avec 1% de Brij97 (Le Naour *et al.*, 2006a). Il a également été montré que les TEMs sont moins sensibles à une déplétion en cholestérol que les radeaux lipidiques, ce qui suggère donc une composition lipidique différente (Claas *et al.*, 2001).

Ainsi, les tétraspanines au sein du *tetraspanin web* permettent de réguler l'activité de nombreuses protéines, non seulement via des interactions directes, mais également en jouant le rôle d'organiseurs membranaires, en régulant la disponibilité et les interactions des protéines au sein des TEMs.

3- Dynamique membranaire des tétraspanines et TEAs

L'usage de la microscopie TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*) couplée au SMT (*Single-Molecule Tracking*) ainsi que les méthodes de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) ont permis d'étudier la dynamique membranaire des tétraspanines au sein des TEMs.

Le FRAP consiste à photoblanchir, par illumination brève et intense, une région de la membrane plasmique préalablement marquée. L'analyse du recouvrement de la fluorescence de cette région, qui est dépendant de la mobilité des molécules environnantes, permet de déterminer le coefficient de diffusion membranaire d'une protéine et de définir la proportion de molécules mobiles et immobiles.

La microscopie TIRF utilise les ondes évanescentes d'un laser et permet ainsi d'illuminer une fine épaisseur (100-300 nm) de la partie basale des cellules et donc l'observation relativement précise de la membrane basale. Cette technique de microscopie couplée au SMT permet le suivi de molécules uniques marquées généralement avec des fragments Fab d'anticorps couplés à un fluorophore. Grâce à une série d'images prises à haute résolution, le SMT en TIRF permet de suivre la position d'une protéine et de reconstruire sa trajectoire. Cette technique permet de distinguer

des trajectoires Browniennes, confinées ou mixtes et de mesurer les coefficients de diffusion des protéines observées à la surface des membranes. Il a ainsi été montré, à travers l'exemple de la molécule CD9, que les tétraspanines évoluent entre différentes zones de la membrane plasmique, où leur coefficient de diffusion varie. Ainsi, des molécules de CD9 co-diffusent en présentant un mouvement Brownien, alors que ce mouvement devient confiné dans les zones enrichies en CD9. Le fait que les molécules de CD9 puissent co-diffuser en dehors des zones enrichies en CD9 avec des coefficients de diffusion différents à l'extérieur et à l'intérieur de ces zones, suggère un échange permanent entre des zones enrichies en tétraspanines (TEAs) et des clusters formés par des tétraspanines qui co-diffusent (Espenel *et al.*, 2008). D'autres études ont mis en évidence des régions dans lesquelles se concentrent les tétraspanines et où leur diffusion est réduite. Ainsi, il a été montré que CD151 et CD9 étaient recrutées au niveau des plateformes adhésives endothéliales (EAPs). En effet, ces plateformes sont riches en protéines d'adhérence telles que ICAM-1 et VCAM-1 qui sont des protéines partenaires de CD9 et CD151, respectivement (**Tableau 2**). Des études de FRAP ont montré qu'au sein de ces structures, la diffusion des tétraspanines était réduite (Barreiro *et al.*, 2008). De manière intéressante, certains anticorps sont capables de reconnaître les tétraspanines associées aux TEAs. C'est le cas de l'anticorps MT81w qui reconnaît la tétraspanine CD81 murine associée aux TEAs. Il a été mis en évidence que dans les cellules dans lesquelles CD81 était plus associée aux TEAs, son coefficient de diffusion était réduit (Potel *et al.*, 2013; Silvie, 2006). L'aspect dynamique des tétraspanines est représenté sur la **Figure 31**.

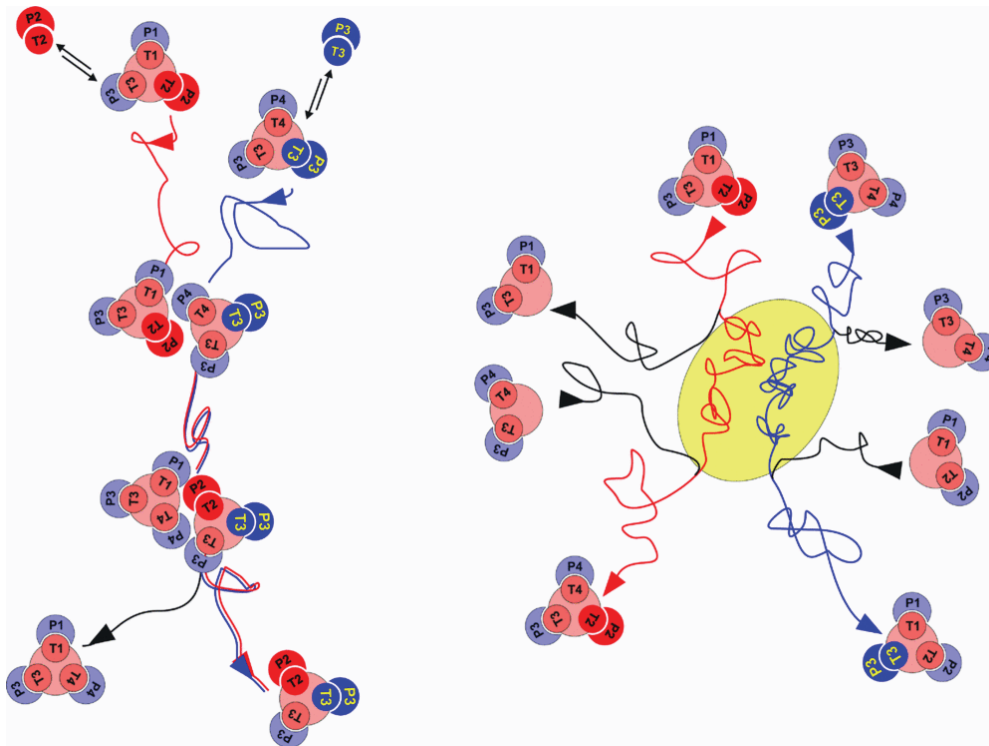


Figure 31 : Vue dynamique du tetraspanin web.

Différents complexes tétraspanine/protéine partenaire sont représentés en rouge ou en bleu. Ces complexes s'associent entre eux pour former des clusters dont les trajectoires sont indiquées par des flèches. Ces clusters patrouillent au niveau de la membrane plasmique et forment le *tetraspanin web*. Un enrichissement local en tétraspanines associé à une composition lipidique particulière (en jaune à droite) forme les TEAs, au sein desquels les mouvements des tétraspanines sont réduits. Les TEAs et les clusters de tétraspanines sont en perpétuel échange à la surface de la membrane plasmique (D'après Charrin *et al.*, 2009).

C- Rôles physiologiques des tétraspanines

Les tétraspanines sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que l'adhésion, la migration, la fusion ou la prolifération cellulaire. L'utilisation de souris *Knock-Out* (KO), de silencing et d'anticorps a permis de mieux comprendre les rôles des tétraspanines, même si ceux-ci restent encore largement méconnus. En effet, les rôles probablement redondants d'un certain nombre de tétraspanines, combinés à leur présence quasi-ubiquitaire, ont rendu leur étude d'autant plus difficile.

L'étude de souris KO a permis d'identifier l'implication de quelques tétraspanines dans certaines fonctions. C'est le cas par exemple des souris n'exprimant pas CD9, pour lesquelles il a été montré que cette protéine était impliquée dans la fusion entre spermatozoïde et ovocyte (Le Naour, 2000). Plus tard, il a également été démontré que

CD81 participait aussi à ce processus de fusion (Rubinstein *et al.*, 2006). Cependant le mécanisme moléculaire exact du rôle de ces deux tétraspanines dans la fusion reste à déterminer. Des expériences sur des ovocytes n'exprimant aucune de ces tétraspanines et pour lesquelles l'expression peut être rétablie en transfectant des ARNm, suggèrent que les deux tétraspanines ne coopèrent pas dans le mécanisme de fusion (Ohnami *et al.*, 2012).

Des mutations retrouvées chez des patients atteints de maladies rares ont également permis de mettre au jour l'implication des tétraspanines dans certaines de ces maladies. Ainsi, des mutations dans des tétraspanines telles que ROM-1 ou la périphérine/RDS, exprimées uniquement au niveau de la rétine, sont associées à des dystrophies de la rétine chez l'Homme pouvant entraîner la cécité (Kohl *et al.*, 1998).

De manière intéressante, en interagissant avec leurs protéines partenaires, les tétraspanines sont capables de réguler leur activité, ce qui permet de mieux comprendre les rôles physiologiques de ces protéines. Ainsi, une mutation rare entraînant la perte du domaine de liaison de CD151 aux intégrines, est responsable d'une épidermolyse bulleuse pré-tibiale, caractérisée entre autres par la présence de cloques au niveau de la peau, probablement due à un défaut d'adhérence épithéliale, ainsi que par une insuffisance rénale (Karamatic Crew, 2004). De manière intéressante, des souris présentant une mutation dans l'intégrine $\alpha 3$, ainsi que des mutations dans l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ chez l'Homme, sont responsables d'un phénotype similaire (DiPersio *et al.*, 1997; Ruzzi *et al.*, 1997). Ceci renforce donc l'importance de l'interaction entre CD51 et les intégrines dans la régulation de la fonction de ces dernières et plus particulièrement dans l'organisation de la membrane basale. De plus, il a été montré que des souris KO pour le gène codant CD151 présentaient également une insuffisance rénale. Ceci semble dû à la redistribution de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ dans les cellules glomérulaires des reins (Sachs *et al.*, 2012). De manière générale, CD151 est importante dans le renforcement de l'adhésion cellulaire, notamment le renforcement de l'interaction entre les intégrines et la laminine (Lammerding *et al.*, 2003).

De façon similaire, CD82 a un rôle de suppresseur de tumeur (Dong *et al.*, 1995) qui peut s'expliquer par son interaction avec EGF-R. En effet, CD82 induit l'endocytose du récepteur, impliqué dans la progression tumorale, réduit sa dimérisation suite à la fixation de ses ligands et en atténue la voie de signalisation (Odintsova, 2003; Odintsova *et al.*, 2000). Le mécanisme est cependant controversé. En effet, une étude a montré que

CD82, en s'associant à EGF-R, en réduit la mobilité membranaire, ce qui le rend plus accessible à la machinerie endocytaire (Odintsova, 2003), alors qu'une autre étude a montré au contraire que cette association augmente la diffusion membranaire de EGF-R (Danglot *et al.*, 2010).

Les tétraspanines sont également impliquées dans le système immunitaire. Ainsi les tétraspanines telles que CD81 et CD37 sont impliquées dans la régulation de l'activation des lymphocytes T (Soldaini *et al.*, 2003; van Spruel *et al.*, 2004), ainsi que dans la production d'anticorps par les lymphocytes B (Knobeloch *et al.*, 2000; Maecker & Levy, 1997).

Enfin, les tétraspanines, et plus particulièrement CD63, sont retrouvées dans des compartiments intracellulaires. Il a ainsi été suggéré que les tétraspanines pouvaient jouer un rôle dans la régulation du transport intracellulaire, en particulier de leurs protéines partenaires. Il a ainsi par exemple été montré que CD63 était impliquée dans le recyclage de la pompe H⁺K⁺ATPase, en assurant son transport entre la membrane plasmique et les compartiments intracellulaires (Duffield *et al.*, 2003). Dans le même ordre d'idée, il a été montré que CD9, et de façon moindre CD151, permettaient d'augmenter la demi-vie de CLDN-1 à la surface cellulaire (Kovalenko *et al.*, 2007).

D- Tétraspanines et infections virales

Les tétraspanines et les domaines membranaires associés sont utilisés par un vaste panel de pathogènes, allant des bactéries aux virus en passant par les champignons et les parasites, pour infecter leurs cellules hôtes. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons plus particulièrement aux virus qui utilisent les tétraspanines pour différentes étapes de leur cycle de réplication. Les tétraspanines sont en effet utilisées par de nombreux virus, aussi bien dans des processus d'entrée que dans l'assemblage et même lors de la réplication virale.

1- Tétraspanines et Retroviridae

Le rôle des tétraspanines dans le cycle de réplication du HIV a été particulièrement étudié. Le HIV est un *lentivirus*, un virus enveloppé à ARN(+) qui infecte les cellules exprimant le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 et/ou CXCR4,

lui conférant un tropisme essentiellement pour les lymphocytes T CD4⁺, les macrophages et les DCs. L'entrée du virus se fait par reconnaissance entre une glycoprotéine de surface, gp120, et ses récepteurs et corécepteurs cellulaires. Cette interaction aboutit à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique, permettant ainsi l'entrée de la capsid virale dans le cytoplasme. L'ARN viral est ensuite rétrotranscrit en ADN par la transcriptase inverse au sein d'un complexe multiprotéique, formé par des protéines virales et cellulaires. Ce complexe permet l'import du génome viral dans le noyau où il est intégré au sein du génome de la cellule hôte. Les gènes viraux sont ensuite transcrits et traduits. Les protéines structurales Gag-Pol et Env, en association avec deux copies du génome viral néo-synthétisé s'assemblent à la membrane plasmique pour former des particules virales qui bourgeonnent au niveau des TEMs. En effet, il a été montré que non seulement les sites de bourgeonnement, mais également les particules virales elles-mêmes, étaient riches en CD63, CD81, CD82 et CD9 (Jolly & Sattentau, 2007; Orentas & Hildreth, 1993; Sato *et al.*, 2008). Il a ainsi été suggéré que les particules virales bourgeonneraient au niveau des compartiments intracellulaires riches en tétraspanines, probablement des endosomes, en étant sécrétées à la manière des exosomes, avec lesquels elles partagent de nombreuses caractéristiques (Deneka *et al.*, 2007). De manière intéressante, il a été montré que la protéine Gag médie le recrutement des différentes tétraspanines, en particulier cela a été démontré pour CD9 et CD81 grâce à du SMT (Krementsov *et al.*, 2010), ce qui permet ainsi de créer des zones à la membrane qui deviennent les précurseurs des synapses virologiques entre deux cellules, permettant la transmission de cellule à cellule du HIV. En effet, les tétraspanines permettent de réguler la formation de ces synapses et d'empêcher la formation d'un syncytium (Krementsov *et al.*, 2009). De plus, cette hypothèse est renforcée par le fait que certaines protéines du HIV, telles que Vpu et Nef, médient la diminution de l'expression des tétraspanines à la surface cellulaire, ce qui permet de réguler la balance entre la formation de synapses virologiques, qui favorisent l'infection, sans pour autant entraîner la formation de syncytia (Haller *et al.*, 2014; Lambelé *et al.*, 2015).

En plus de leur rôle dans l'assemblage et la sécrétion du HIV, les tétraspanines sont également impliquées dans des étapes plus précoces du cycle. En effet, l'utilisation d'anticorps dirigés contre CD63 a montré que cette tétraspanine était essentielle à une étape post-fusion (Lindern *et al.*, 2003). Ceci est renforcé par d'autres études qui ont

montré que le silencing de CD63 inhibe la transcription inverse du virus ou une autre étape post-fusion (Li *et al.*, 2011; 2014). De manière intéressante, CD63 est impliquée dans la régulation du transport de CXCR4 dans les lymphocytes T (Yoshida *et al.*, 2008).

De façon similaire au HIV, il a été montré que les tétraspanines, et plus particulièrement la tétraspanine CD82, étaient essentielles à l'assemblage et à la transmission du HTLV-1, (*Human T-Lymphotropic Virus 1*), un δ -retrovirus. En effet, il a été montré que la protéine Gag du HTLV-1 colocalisait avec des domaines riches en tétraspanines à la membrane plasmique. De manière intéressante, la protéine Gag interagit avec CD82 une fois à la membrane plasmique, ce qui permet la co-diffusion de ces protéines au niveau des synapses virologiques (Mazurov *et al.*, 2006). Par ailleurs, la surexpression de CD82 bloque la transmission cellule-cellule du HTLV-1, ce qui suggère que, de façon similaire au HIV, la tétraspanine CD82 régule la formation de syncytia et des synapses virologiques (Pique *et al.*, 2000).

Enfin, l'infection par le virus de l'immunodéficience féline (FIV), un autre *lentivirus*, est également régulée par les tétraspanines. En effet, il a été montré que l'utilisation d'anticorps reconnaissant CD9 inhibe l'infection (Willett *et al.*, 1994). De plus, CD9 interviendrait dans une étape tardive du cycle cellulaire, au moment de l'assemblage et de la sécrétion (de Parseval *et al.*, 1997; Willett *et al.*, 1997), suggérant un mécanisme similaire à ce qui est observé pour HIV et HTLV-1.

2- Tétraspanines et papillomavirus

Les *papillomavirus* sont des virus appartenant à la famille des *Papillomaviridae* dont on connaît 170 génotypes infectant l'Homme. Ce sont des virus causant des pathologies allant de simples verrues jusqu'au développement de cancers, en particulier le cancer du col de l'utérus, provoqué essentiellement par les HPV-16 et 18 (*Papillomavirus* humains de type 16, 18). Ce sont des virus non enveloppés à ADN double-brin dont la capsid est formée des protéines L1 et L2. Le virus infecte les cellules des épithéliums basaux de la peau et des muqueuses, en interagissant avec des récepteurs primaires tels que des GAGs comme syndecan-1 et des récepteurs secondaires, telles que des protéines de la matrice extracellulaire comme la laminine-332, puis pénètre dans la cellule via les TEMs. Après une endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline (Spoden *et al.*, 2013), la particule virale est décapsidée et

l'ADN viral est transcrit au niveau du noyau puis traduit afin de former de nouvelles particules virales.

Ainsi, le virus utilise les TEMs pour pénétrer dans ses cellules cibles. En effet, il a été montré par des études de colocalisation, que les particules virales de HPV-16 colocalisaient avec des domaines riches en CD151 à la surface cellulaire et étaient internalisées par endocytose à partir de ces domaines. La particule virale colocalise alors avec CD151 et CD63 au niveau des endosomes. Des études de silencing ont confirmé l'implication de CD151 dans l'entrée virale, de même que l'utilisation d'anticorps qui a montré l'importance de CD151 et de CD63. Il semblerait que CD151 soit nécessaire à l'internalisation de la particule virale, puisque les particules restent bloquées à la surface dans des cellules n'exprimant plus CD151 (Spoden *et al.*, 2007). De plus, l'usage de mutants de CD151 incapables de lier les intégrines et de mutants non palmitoylés, qui ne peuvent plus interagir avec d'autres tétraspanines, dans des cellules n'exprimant plus CD151, a montré que l'association de CD151 aux intégrines et son association aux TEMs en général, étaient essentielles à l'entrée du virus (Scheffer *et al.*, 2013). Ceci suggère donc que d'autres éléments des TEMs, en plus des intégrines, sont importants pour l'entrée virale. Il a par ailleurs été suggéré que les TEMs pouvaient permettre l'interaction entre la particule virale et ses récepteurs secondaires (Scheffer *et al.*, 2014).

3- Tétraspánines et autres virus

D'autres études ont montré des interactions entre tétraspanines et virus mais celles-ci ont été moins décrites que les deux exemples précédents.

Ainsi, CD151 est également importante pour la réplication du virus du syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (PRRSV). Le PRRSV est un virus de la famille des *Arteriviridae*. C'est un virus enveloppé à ARN(+) qui infecte uniquement les porcs et cible essentiellement les macrophages. Le virus pénètre dans ses cellules cibles par endocytose dépendante de la clathrine via l'interaction avec ses différents récepteurs que sont les héparanes sulfates (Delputte *et al.*, 2002), le récepteur porcin à la sialoadhésine (Vanderheijden *et al.*, 2003), ou encore le récepteur scavenger CD163 (Patton *et al.*, 2009). Après décapsidation et traduction de l'ORF codant la polymérase

virale, un ARN(-) est synthétisé, qui sert de matrice à la synthèse d'ARN(+) sous génomique, qui permet ensuite la traduction des différentes protéines virales (Shanmukhappa *et al.*, 2007). La particule virale une fois assemblée bourgeonne au niveau du Golgi et est sécrétée par exocytose ou par la lyse des cellules (Suárez, 2000). De manière intéressante, CD151 est capable d'interagir avec la région 3'-UTR des ARNs viraux. Comme cela a été montré pour d'autres virus, des protéines de l'hôte peuvent réguler la réplication virale en interagissant avec la région 3'-UTR de l'ARN(+) viral. C'est par exemple le cas avec le virus de West Nile et la protéine EF-1 α (Translation elongation factor-1 α) (Blackwell & Brinton, 1997). L'interaction, entre CD151 et la région 3'-UTR des ARNs du PRRSV est capable de réguler la réplication du virus. En effet, une étude a montré que non seulement l'ARN viral et CD151 étaient capables d'interagir *in vitro*, mais également, que les cellules susceptibles à l'infection exprimaient CD151 alors que les cellules non susceptibles n'expriment pas cette protéine. De plus, la transfection de CD151 dans les cellules qui ne répliquent pas le virus, suffit à restaurer l'infection. Enfin, la surexpression et le silencing ou l'usage d'anticorps α -CD151 entraînent respectivement une augmentation et une inhibition de l'infection (Shanmukhappa *et al.*, 2007). De manière intéressante, une étude plus récente a identifié des micro ARNs qui ciblent naturellement CD151 chez le porc. Il a été montré que la surexpression de l'un d'entre eux, miR-506, inhibe l'infection par le PRRSV (Wu *et al.*, 2014a). Cependant, aucun mécanisme moléculaire ne permet actuellement d'expliquer l'implication exacte de CD151 dans la réplication virale.

Les tétraspanines jouent également un rôle dans le virus de la maladie de Carré (CDV), un virus qui atteint un grand nombre d'espèces, essentiellement des carnivores et étant particulièrement grave chez le chien où il donne des symptômes proches de ceux de la rougeole, pouvant être fatales dans la moitié des cas. C'est un virus de la famille des *Paramyxoviridae* du genre *Morbilivirus*. Le CDV est un virus à ARN(-) enveloppé qui cible notamment les lymphocytes B et T mais également des cellules de la peau ou du cerveau. L'interaction entre les hémagglutinines de surface du virus et au moins un récepteur identifié, CD150, permet la fusion du virus au niveau de la membrane plasmique (Ludlow *et al.*, 2014). L'ARN(-) est transcrit par la polymérase virale puis traduit. Après réplication, les protéines virales et l'ARN(-) sont recrutés à la membrane plasmique où les nouvelles particules bourgeonnent (Harrison *et al.*, 2010).

Une première étude a réalisé un screening d'anticorps produits par des souris immunisées à l'aide de cellules permissives au CDV. De manière intéressante, un anticorps bloquant CD9 était capable d'inhiber l'infection. Par la suite, l'expression de CD9 dans des cellules non permissives a suggéré un rôle dans l'entrée de cette tétraspanine (Loffler *et al.*, 1997). Il a par la suite été montré par des études de cinétique que CD9 intervenait dans l'entrée virale notamment après attachement des particules virales. De plus, le blocage de CD9 inhibe la formation de syncytia, suggérant un rôle de CD9 dans la transmission du virus (Schmid *et al.*, 2000; Singethan, 2006).

Les TEMs ont également été impliqués dans l'assemblage du virus Influenza A (IAV). L'IAV, virus d'une grippe saisonnière et de la grippe aviaire, est un virus de la famille des *Orthomyxoviridae*, enveloppé, à ARN(-) segmenté. L'hémagglutinine virale lie l'acide sialique des cellules pulmonaires et la particule virale est endocytée. Après fusion à pH acide avec la membrane d'un endosome et désorganisation de la matrice virale, l'ARN rejoint le noyau où il est transcrit. Après synthèse des protéines virales et réplication, l'ARN(-) est exporté hors du noyau et l'assemblage et le bourgeonnement ont lieu au niveau de la membrane plasmique apicale (Samji, 2009). Bien que les virions semblent majoritairement bourgeonner au niveau des radeaux lipidiques, des anticorps ciblant CD9 sont capables d'inhiber l'infection (Khurana *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que CD9 et CD81 étaient incorporées dans la particule virale, suggérant que les virions bourgeonnent au niveau des TEMs (Shaw *et al.*, 2008). Egalement, une étude a montré par silencing que CD81 pouvait être impliquée dans l'entrée (König *et al.*, 2010). Ceci a été renforcé par une étude plus récente qui montre que CD81 aurait à la fois un rôle à une étape tardive de l'entrée, probablement au moment de la fusion, et un rôle au moment de l'assemblage, puisque CD81 est recrutée aux sites de bourgeonnement (He *et al.*, 2013a). Cependant, le rôle des tétraspanines dans l'assemblage reste controversé.

Enfin, la tétraspanine CD81 et sa dynamique membranaire jouent un rôle essentiel dans l'entrée, mais aussi dans la réplication du HCV. Ces rôles ont été décrits en détails dans Fénéant et collaborateurs (Fénéant *et al.*, 2014) (Annexe). De plus, récemment, des études ont décrit l'implication de CD63 ainsi que de CD151 dans l'entrée du HCV (III A) 2) e)).

VIII- LES IONOPHORES ET LEUR ACTIVITE ANTIVIRALE

A- Généralités

1- Définition

Le terme ionophore est utilisé depuis 1967 pour définir des molécules capables de transporter des ions au travers des membranes biologiques. Le premier ionophore à avoir été décrit est la gramicidine, issue de la culture de *Bacillus Brevis* (Hotchkiss & Dubos, 1941). Les propriétés antibactériennes de nombreux ionophores ont longtemps fait penser que ces molécules étaient nécessairement des antibiotiques. Aujourd'hui on sait que certains ionophores peuvent aussi jouer des rôles physiologiques importants.

2- Classification

On distingue trois catégories d'ionophores. D'une part, on trouve les ionophores de type transporteurs mobiles qui franchissent les membranes lipidiques couplés à des ions. Ces transporteurs mobiles sont divisés en deux catégories selon que la molécule possède ou non une charge résiduelle. Les ionophores à charge résiduelle nulle sont appelés ionophores neutres **(1)**. Ils ont la propriété de se coupler à des ions en formant alors un complexe chargé qui va traverser les membranes suivant leur gradient électrochimique. Cette catégorie d'ionophores est représentée par des molécules telles que la valinomycine. Les ionophores polyéthers (ou carboxyliques) **(2)**, électriquement chargés, forment quant à eux des complexes électroneutres ou zwitterioniques avec des ions. Le transport des ions est alors indépendant du potentiel membranaire mais dépendant des gradients ioniques et notamment du pH (**Figure 32**). On retrouve dans cette catégorie des molécules telles que la Monensine ou la nigéricine. D'autre part, on trouve des ionophores capables de former des canaux ioniques transmembranaires, permettant le passage de différents ions. Ces derniers sont qualifiés de quasi-ionophores **(3)**. La gramicidine est l'un d'entre eux (Pressman, 1976).

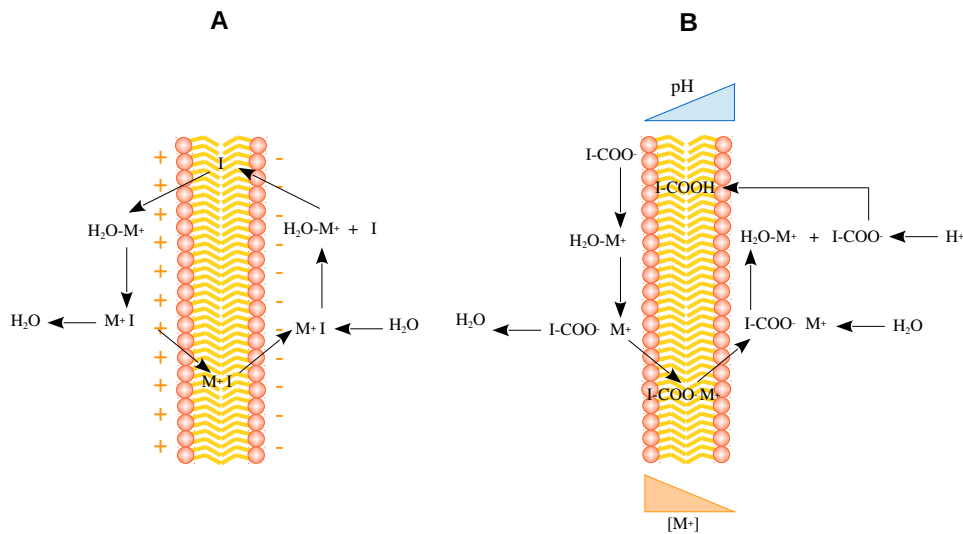


Figure 32 : Mécanismes de transport des ions par les ionophores mobiles.

A) Transport de cations monovalents (M^+) par les ionophores (I) neutres suivant le potentiel membranaire. **B)** Transport de cations monovalents par les ionophores polyéthers ($I-COO^-$) suivant les gradients ioniques et de pH.

3- Affinité

L'affinité d'un ionophore pour certains ions est spécifique et dépendante de la structure moléculaire de ce dernier. Les ionophores, généralement, ont la propriété de former des pseudo-cycles, emprisonnant les ions au sein d'une cavité polaire, tandis que le reste de la molécule présente des propriétés hydrophobes lui permettant de traverser les membranes lipidiques. La taille de la cavité polaire est dépendante de la rigidité du squelette moléculaire. Une petite cavité privilégie le transport d'ions de faibles dimensions tels que les ions Na^+ , comme c'est le cas pour la Monensine ou certains ionophores synthétiques (Christensen *et al.*, 1971; Lutz *et al.*, 1970). A l'inverse, une cavité polaire plus grande, combinée à une faible énergie libre de la molécule, privilégie le transport d'ions de plus grandes tailles comme les ions K^+ (Ivanov *et al.*, 1969; Pinkerton *et al.*, 1969). Enfin, d'autres ionophores, de taille trop faible pour former un pseudo-cycle et/ou ne présentant pas d'affinité particulière pour certains ions ont été décrits, telles que les enniatines (Dobler *et al.*, 1969; Ovchinnikov *et al.*, 1969; 1974).

4- Rôles biologiques et applications

a- Rôles physiologiques

Les ionophores naturels sont majoritairement des métabolites secondaires dont l'importance biologique n'est pas, à priori, primordiale pour la survie, la croissance ou la reproduction de l'espèce qui les produit. En effet, les rôles physiologiques des ionophores sont encore pour la plupart méconnus. Bien qu'ayant une activité antibactérienne, il ne semble pas que cette fonction soit physiologiquement significative. En revanche, une étude a montré que ces métabolites secondaires pouvaient conférer un avantage sélectif dans certaines conditions environnementales. Ainsi l'étude d'un mutant de la souche bactérienne *Streptomyces Griseus* déficient pour la production d'un macrotétrolide, un ionophore neutre, a révélé que ce mutant mourrait dans un environnement à forte concentration en Na^+ . En effet, l'ionophore neutre permet à la bactérie sauvage de puiser des ions K^+ dans un environnement pauvre en ces ions en suivant le potentiel membranaire, alors que la bactérie mutante en est incapable et, au contraire, perd ses ions K^+ (Kanne & Zähler, 1976).

Les rôles physiologiques sont plus évidents lorsque l'on considère les sidérophores. Les sidérophores sont des ionophores capables essentiellement de transporter des ions Fe^{3+} . Les sidérophores, produits aussi bien par des bactéries, des champignons et des plantes, permettent d'optimiser le prélèvement du fer dans leur environnement, aussi bien dans le sol que dans les organismes qu'ils infectent. Ainsi les bactéries des genres *Streptococcus* ou *Bacillus* sont capables d'utiliser le fer issu de la ferritine, de la transferrine, de la lactoferrine ou d'autres hémoprotéines, grâce aux sidérophores qu'elles sécrètent (Ge & Sun, 2014; Segond *et al.*, 2014). De manière intéressante, certains sidérophores facilitent la dissolution des oxydes de fer afin d'augmenter la disponibilité en fer dans l'environnement pour les organismes qui les produisent (Holmén & Casey, 1996).

b- Applications

i) Etudes des transferts membranaires

Si leurs rôles physiologiques sont globalement méconnus, les ionophores ont en revanche trouvé de nombreuses applications biologiques depuis leur découverte. Ainsi, leur utilisation a permis de mieux comprendre le fonctionnement des mitochondries et des chloroplastes. En effet, l'ajout de valinomycine dans un milieu de culture de mitochondries de foie de rat permet une synthèse d'ATP via un flux entrant de K^+ (Cockrell *et al.*, 1967). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant de la valinomycine sur des chloroplastes d'épinards (Uribe & Li, 1973). Ces études ont notamment permis de faire le lien entre le potentiel membranaire des mitochondries et des chloroplastes et la production d'ATP.

ii) Rôle antibactérien

Les ionophores sont également intéressants de part leurs puissants effets anti-infectieux contre des parasites, des bactéries, des virus ou encore des cellules cancéreuses (**Tableau 3** et **Tableau 4**).

Le rôle des ionophores comme antibiotiques a été longuement documenté. Selon les ionophores, on observe des activités antibactériennes aussi bien sur des bactéries Gram-positif que sur des bactéries Gram-négatif. Ainsi, la salinomycine est efficace aussi bien contre des bactéries Gram-positif (*Clostridium*) que Gram-négatif (*Salmonella*) (Bolder *et al.*, 1999; Kyriakis *et al.*, 1995.). Cependant, de manière générale les bactéries Gram-positif sont plus sensibles aux ionophores que les bactéries Gram-négatif. Ceci s'explique par l'organisation membranaire des bactéries Gram-négatif et la présence d'une paroi dans l'espace périplasmique les rendant moins perméables aux molécules hydrophobes de poids moléculaire trop élevé. Ainsi des ionophores tels que la nigéricine, la calcimycine, la Monensine ou la valinomycine sont inefficaces contre les bactéries Gram-négatif (Butaye *et al.*, 2003).

L'effet antibactérien des ionophores s'explique par leur activité de transport de cations. En modifiant les gradients d'ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} notamment, les ionophores ont un effet toxique sur les bactéries cibles.

De manière intéressante, relativement peu de résistances aux ionophores ont été décrites. Cependant les mécanismes de résistances observées n'ont pas pu être expliqués. Le seul mécanisme de résistance connu est celui d'une souche bactérienne, *Streptomyces longisporoflavus*, qui code un système d'efflux ATP-dépendant de type

transporteur ABC (*ATP Binding Cassette*), qui la protège d'un ionophore qu'elle produit, la tétronasine (Linton *et al.*, 1994). Ceci rend les ionophores intéressants contre les bactéries multirésistantes. Ainsi, les noboritomycines A et B sont actives contre des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline (Keller-Juslén *et al.*, 1978). De plus, la laidlomycine, la salinomycine et la narasine sont actives contre des souches multirésistantes MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus*) de *Staphylococcus aureus* et des souches multirésistantes VRE (*Vancomycin-Resistant Enterococci*) d'*Enterococcus* (Yoo *et al.*, 2007).

iii) Rôle antiparasitaire

Les ionophores sont également actifs contre un certain nombre de parasites. Ainsi, les ionophores polyéthers telles que la Monensine et la narasine inhibent les parasites du genre *Eimeria*. Si les ionophores ont un effet cytotoxique en affectant le fonctionnement des mitochondries, il a été montré que, dans le cas de la narasine et de la Monensine, les concentrations inhibant l'infection étaient trop faibles pour affecter les mitochondries des parasites, suggérant un autre effet de ces ionophores. Les ionophores seraient accumulés dans les sporozoïtes et perturberaient les gradients ioniques, ce qui entraînerait un choc osmotique (Smith & Strout, 1979). Avec un mécanisme similaire, la salinomycine entraîne l'éclatement de la forme sanguine de *Trypanosoma brucei* via un influx de Na^+ dans le parasite (Steverding & Sexton, 2013). Également, en facilitant le transport de différents ions (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), les ionophores perturbent les gradients ioniques et en particulier, augmentent la concentration en calcium intracellulaire, comme cela a été montré pour la salinomycine (Lattanzio & Pressman, 1986).

De manière intéressante, l'amphotéricine B est utilisée chez l'Homme dans le traitement des leishmanioses causées par des parasites appartenant au genre *Leishmania*. Il semblerait que l'amphotéricine B agisse via divers mécanismes. L'amphotéricine B est un quasi-ionophore qui forme des canaux ioniques dans les membranes riches en ergostérols, entraînant une fuite de K^+ ainsi qu'une désorganisation membranaire (Bolard, 1986; Brajtburg *et al.*, 1990; Urbina *et al.*, 1987). Cette fuite de K^+ peut entraîner la mort cellulaire. Cependant, ce seul mécanisme ne suffit pas à expliquer l'action de cette molécule sur les parasites. En effet,

l'amphotéricine B est également impliquée dans la formation de radicaux libres de l'oxygène qui sont toxiques pour la cellule (Lamy-Freund *et al.*, 1985; Purkait *et al.*, 2012).

iv) Rôle antiviral

L'activité antivirale des ionophores s'explique essentiellement par deux mécanismes. En modifiant les concentrations ioniques et le pH des compartiments intracellulaires, des vésicules telles que les endosomes sont affectées. Un certain nombre de virus pénètre dans leurs cellules hôtes via des voies d'endocytose. Une modification des caractéristiques physico-chimiques des endosomes, que ce soit au niveau de leur pH ou de leur potentiel membranaire, peut alors altérer l'entrée virale. Ainsi la valinomycine bloque l'entrée du Virus de la Forêt de Semliki (SVF) via une dépolarisation membranaire (Helenius *et al.*, 1985). La perturbation du pH des endosomes induite par la nigéricine inhibe également la fusion des *Spumavirus* (Picard-Maureau *et al.*, 2003).

Par ailleurs, l'ensemble des compartiments intracellulaires peut être modifié. Ainsi, le Golgi et le RE sont affectés par les ionophores. L'implication du RE et surtout du Golgi dans la synthèse et les modifications post-traductionnelles des protéines, fait qu'en présence d'ionophores, les modifications post-traductionnelles, la maturation des protéines virales ainsi que le transport des protéines structurales peuvent être affectés. Ceci perturbe alors l'assemblage et la sécrétion de particules virales infectieuses. Ainsi, en présence de calcimycine, un ionophore à forte affinité pour le calcium, le clivage protéolytique de l'hémagglutinine du virus HPAI (*Highly Pathogenic Avian Influenza A*) n'a pas lieu. En effet, ce clivage dépend d'une enzyme dépendante du calcium (Klenk *et al.*, 1984).

D'autres mécanismes, plus anecdotiques, ont toutefois été décrits. Ainsi, la nigéricine semble capable d'inhiber la réplication du virus de la vaccine en affectant la transcription de gènes précoces ainsi que la réplication de l'ADN (Myskiw *et al.*, 2010).

v) Rôle antifongique

Le rôle antifongique, bien qu'observé à de nombreuses reprises est beaucoup moins bien caractérisé et les mécanismes peu explorés. Cependant, il a été par exemple montré que la calcimycine, de par son affinité pour les cations bivalents, affecte la concentration en Mg^{2+} de *Candida albicans* et inhibe la formation des tubes germinatifs. Or, une élévation en Mg^{2+} est observée lors de la formation de ces tubes germinatifs (Walker *et al.*, 1984). Un mécanisme similaire a été décrit pour le lasalocide qui inhibe la formation des tubes germinatifs de *Sporothrix schenckii* via une modification du gradient de magnésium (Alsina & Valle, 1984).

vi) Rôle anticancéreux

En plus d'agir contre de nombreux agents infectieux, les ionophores sont aussi capables de cibler un certain nombre de cellules cancéreuses. Ainsi, la salinomycine est capable d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses de la prostate, de sarcomes et de tumeurs mammaires, ainsi que d'induire la mort de cellules souches cancéreuses (Fuchs *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2009; Ketola *et al.*, 2012; Liffers *et al.*, 2013; Riccioni *et al.*, 2010). La salinomycine est en effet capable d'affecter la voie de signalisation induite par NF- κ B, surexprimé dans de nombreuses cellules cancéreuses, et responsable de l'expression de facteurs pro-angiogéniques et pro-métastatiques tels que le VEGF, l'IL-6, l'IL-8 ou encore le MMP-9 (Ketola *et al.*, 2012). Il a également été montré que la salinomycine affectait l'expression de la protéine anti-apoptotique p21 dans les cellules cancéreuses en augmentant l'activité des protéasomes. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de ces derniers permet de supprimer l'effet de la salinomycine sur p21 (Kim *et al.*, 2012). De façon similaire, la pyrithione, un ionophore à forte affinité pour les ions Zn^{2+} , est capable d'inhiber l'activité de NF- κ B. Cet effet est probablement dû à l'action des ions Zn^{2+} qui permettent de bloquer l'I κ b-kinase (IKK) (Uzzo, 2006).

La nigéricine quant à elle a été décrite comme étant capable de cibler des cellules de carcinomes nasopharyngés en diminuant l'expression de Bmi-1 (Deng *et al.*, 2013). En effet, Bmi-1 est un oncogène qui régule l'expression de p16 et p14, deux suppresseurs de tumeurs (Cao *et al.*, 2011).

Egalement, la gramicidine A est capable d'induire la mort des cellules de carcinomes rénales ainsi que de bloquer la croissance et l'angiogenèse des tumeurs associées en inhibant HIF- α et $-\beta$. En effet, ces deux protéines sont impliquées dans la formation de vaisseaux sanguins en milieu hypoxique (Brocato *et al.*, 2013). Cette inhibition a lieu via l'expression d'un suppresseur de tumeurs, VHL (Vindrieux *et al.*, 2014). De manière intéressante, certains ionophores sont aussi capables de renverser le phénomène de résistance à de multiples drogues (MDR pour *Multi-Drugs Resistance*) qui est très fréquemment observé lors de chimiothérapies. C'est le cas de la laidlomycine, capable d'augmenter plus de 700 fois le ratio de toxicité induite par la colchicine sur des cellules KB-C4, des cellules de carcinomes MDR, ainsi que de l'inostamycine (Kawada *et al.*, 1992; Kawada & Umezawa, 1991).

5- Les ionophores polyéthers

Ces ionophores ont été décrits pour la première fois en 1951 avec leurs représentants que sont le lasalocide ou encore la nigéricine, produits par différentes souches bactériennes du genre *Streptomyces*. On connaît aujourd'hui 53 souches de la famille *Streptomycetaceae*, des genres *Streptomyces*, *Actinomadura* et *Dactylosporangium*, capables de produire des ionophores polyéthers.

Les ionophores polyéthers sont caractérisés par une chaîne carbonée présentant des groupes alkyles leur conférant une grande liposolubilité. Dans cette chaîne carbonée s'insèrent des hétérocycles contenant notamment de l'oxygène comme hétéroatome mais aussi de l'azote. Ces atomes d'oxygène permettent l'insertion de nombreux groupes fonctionnels tels que des groupes hydroxyles, carboxyles, carbonyles ou encore éthers. Ces molécules, bien que non cycliques en elles-mêmes, ont la capacité de se pseudo-cycliser en formant des liaisons hydrogènes entre le groupe carboxyle à la fin de la molécule et, généralement, des groupes hydroxyles en tête de la molécule.

Ces molécules forment des sels avec divers ions métalliques, notamment des cations monovalents ($I-COO \cdot M^+$) entraînant une structure généralement pseudo-cyclique. Elles peuvent également transporter des protons qui sont transportés via des ionophores sous forme acide ($I-COOH$). Certains de ces ionophores sont également capables de transporter des cations bivalents, notamment en formant des complexes entre plusieurs molécules d'ionophores. A ce titre, la calcimycine fait figure d'exception

parmi les ionophores polyéthers en étant le seul connu à ce jour à avoir une affinité plus importante pour les ions bivalents plutôt que pour les ions monovalents, probablement due à la présence de deux atomes d'azote, augmentant l'énergie libre de la molécule (Pfeiffer *et al.*, 1974; Reed & Lardy, 1972).

B- La Monensine A

La Monensine A est un des 120 ionophores polyéthers naturels découverts à ce jour. C'est un produit de fermentation issu de la bactérie *Streptomyces Cinnamomensis* et isolée en 1967 par Agtarap et collaborateurs (Agtarap & Chamberlin, 1967). De formule chimique $C_{36}H_{62}O_{11}$, sa structure cristallographique a été déterminée en 1971 par Lutz et collaborateurs (Lutz *et al.*, 1970) (**Figure 33**). La Monensine peut se complexer à des ions monovalents avec une affinité plus prononcée pour les ions Na^+ ($Ag^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Li^+ \cong NH_4^+$) (Gertenbach & Popov, 1975). Les cations monovalents sont coordonnés avec 6 atomes d'oxygène de la Monensine au sein de la cavité polaire de la molécule. Complexée à un cation monovalent, elle forme un pseudocycle stabilisé par deux liaisons hydrogènes entre les atomes d'oxygène du groupe carboxyle et deux atomes d'hydrogène de groupes hydroxyles à l'autre bout de la molécule.

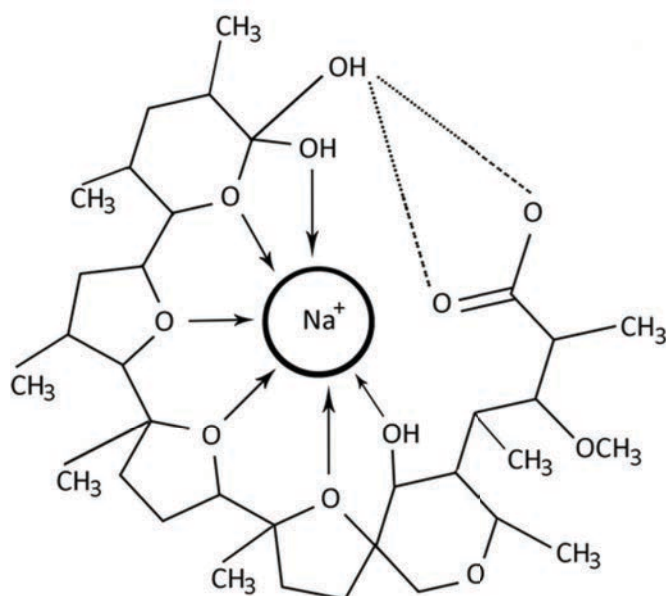


Figure 33 : Structure de la Monensine complexée à un ion monovalent.
(Chapman *et al.*, 2010).

En plus de fonctionner comme un simple antiport électroneutre Na^+/H^+ , la Monensine, sous forme protonée, est aussi capable de transporter des ions Na^+ de façon électrogénique (Huczyński *et al.*, 2012; Nakazato & Hatano, 1991).

La Monensine entraîne donc une augmentation de la concentration en Na^+ dans le cytoplasme et une augmentation du pH. L'augmentation de la concentration en Na^+ entraîne quant à elle indirectement via l'inositol triphosphate le relargage de calcium depuis les compartiments intracellulaires tels que le RE dans le cytoplasme (Nassar-Gentina *et al.*, 1994). La Monensine peut également augmenter la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique libre via un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ favorisant l'entrée de calcium dans la cellule (Wang *et al.*, 1999). Il semblerait que la Monensine puisse également augmenter la concentration en calcium intracellulaire par un mécanisme indépendant des ions Na^+ (Mulkey & Zucker, 1992; Satoh & Satoh, 2007).

1- Monensine et infections

a- Parasitaires

La Monensine est, de manière générale, active sur les parasites appartenant aux Apicomplexa, phylum auquel appartiennent les parasites des genres *Eimeria*, *Plasmodium*, *Toxoplasma* ou encore *Cryptosporidium* et *Neospora*. Les Apicomplexa sont pour la plupart d'entre eux des parasites intracellulaires obligatoires. Ils sont caractérisés par la présence d'un ensemble d'éléments cytosquelettiques et d'organites sécréteurs appelé complexe apical sur les parasites à des stades de développement extracellulaires.

i) Effet anti-coccidial

La Monensine est essentiellement utilisée dans le traitement des coccidioses, des maladies parasitaires dues à des Apicomplexa. La Monensine est ainsi capable de bloquer le développement de parasites du genre *Eimeria* (**Figure 34**). Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'action de la Monensine sur ces parasites. Tout d'abord, en perturbant l'équilibre osmotique, la Monensine entraîne un gonflement de la vacuole des sporozoïtes de ces parasites, la forme présente dans l'environnement, avant qu'ils n'infectent leurs cellules hôtes, pouvant mener jusqu'à l'éclatement de ces

derniers (Smith & Strout, 1979). Ensuite il a été montré que la Monensine est capable de modifier la composition de la membrane des sporozoïtes, notamment le recrutement de la flotillin-1 aux radeaux lipidiques dans la région de l'apex des sporozoïtes, impliquée dans la pénétration des cellules cibles (del Cacho *et al.*, 2007). La Monensine est également capable d'affecter les parasites sous la forme de mérozoïtes, relargués dans l'intestin des animaux infectés (Mehlhorn *et al.*, 1983).

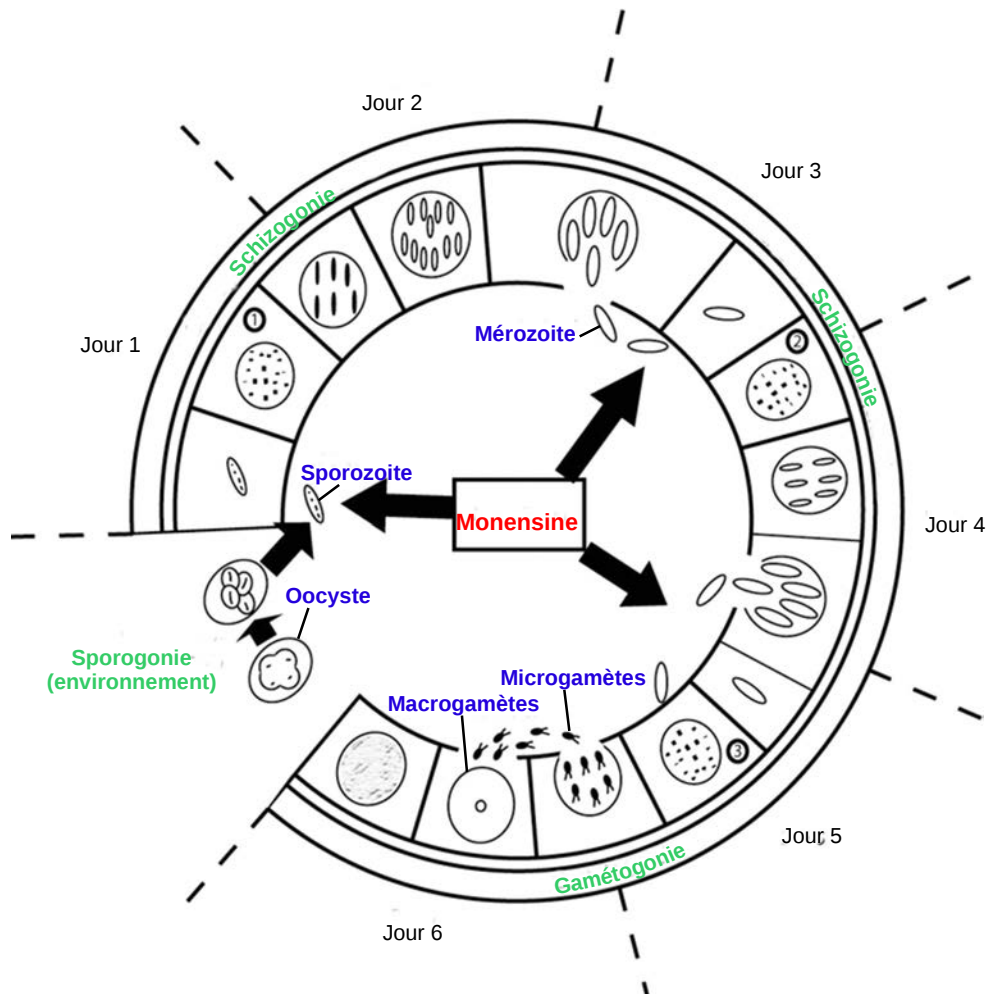


Figure 34 : Cycle de réplication des *Eimeria* et action de la Monensine.

Lors de la phase de sporogonie, les oocystes vont mûrir pour libérer des sporozoïtes qui vont, par ingestion, infecter leur hôte. Une fois dans l'organisme hôte, la phase de schizogonie, le parasite se multiplie de façon asexuée et libère des mérozoïtes qui peuvent infecter de nouvelles cellules. Deux générations de schizontes seulement sont représentées. Enfin la dernière phase du cycle est la gamétogonie, correspondant à la phase sexuée du cycle, avec la production de microgamètes et de macrogamètes. La Monensine affecte le parasite lorsqu'il est sous forme de sporozoïte et de mérozoïte. (D'après Chapman *et al.*, 2010).

ii) Effet antipaludique

De manière intéressante, la Monensine présente des effets antipaludiques (Adovelande & Schrével, 1996; Gumila *et al.*, 1996; 1997; Surolia *et al.*, 2012). Elle est en effet capable d'affecter les parasites responsables de la malaria, appartenant au genre *Plasmodium*, à différents stades de leur développement.

Le *Plasmodium* induit, au cours de l'infection des érythrocytes, des modifications de la perméabilité membranaire à différents substrats, dont des cations, entraînant des modifications des gradients ioniques dont dépend la croissance du parasite. Ainsi, la présence du parasite augmente la concentration en Na⁺ dans le cytoplasme et diminue la concentration en K⁺ au sein de celui-ci. A l'inverse, le cytosol du parasite est quant à lui riche en K⁺ et pauvre en Na⁺ (Elford *et al.*, 1995; Ginsberg, 1990; Tanabe, 1990). Egalement, le parasite induit une augmentation du pool total de calcium intracellulaire (Adovelande *et al.*, 1993; Kramer & Ginsburg, 1991; Krungkrai & Yuthavong, 1983; Leida *et al.*, 1981).

Des études comparatives de l'effet de différents ionophores sur l'infection du *Plasmodium* au stade trophozoite/schizonte, lorsqu'il infecte les érythrocytes, ont mis en évidence que l'affinité pour des ions monovalents plutôt que pour des ions bivalents était essentielle à l'activité antipaludique. Ainsi la Monensine et la nigéricine sont toutes les deux actives contre le *Plasmodium*, alors qu'elles présentent une activité plus importante respectivement pour les ions Na⁺ et K⁺, tandis que la calcimycine, ayant une affinité pour les ions Ca²⁺, est très peu active sur le *Plasmodium* (Gumila *et al.*, 1996). D'autres études ont confirmé l'effet de la Monensine sur le *Plasmodium* à ce stade (Gibot *et al.*, 1999; Gumila *et al.*, 1997). Il semblerait qu'à ce stade de développement, la Monensine, en augmentant le pH des compartiments acides intracellulaires des trophozoites et schizontes, perturbe la capacité du parasite à stocker du calcium (Garcia *et al.*, 1998).

La Monensine est également capable d'inhiber le *Plasmodium* au stade sporozoite, lorsque le parasite infecte les hépatocytes. Ainsi, la Monensine inhibe l'infection des hépatocytes par *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii* (Leitao & Rodriguez, 2010; Mahmoudi & Garcia-Domenech, 2008). Il semblerait que l'inhibition soit due à un effet sur les hépatocytes plutôt qu'à un effet sur les parasites eux-mêmes. Le mécanisme n'est pas connu, mais il est possible que des modifications

dans la concentration en calcium intracellulaire affectent la polymérisation de l'actine qui est essentielle à l'infection par les sporozoïtes (Gonzalez *et al.*, 2009). Il est également possible que la Monensine affecte l'expression en surface de certaines protéines nécessaires à l'entrée des sporozoïtes, telle que la flotillin-1 (Ejigiri & Sinnis, 2009) (**Figure 35**).

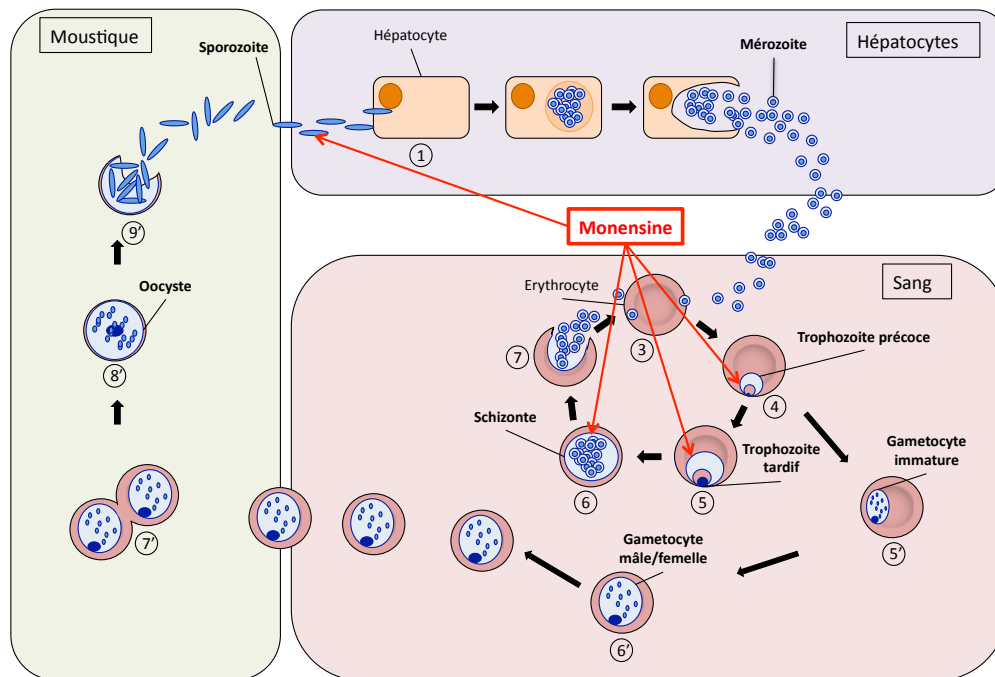


Figure 35 : Cycle de réplication du *Plasmodium* et action de la Monensine.

Les sporozoïtes, injectés par le moustique infectent les hépatocytes où débute la phase de schizogonie (1). A l'issue de la première phase de schizogonie, des mérozoïtes sont libérés (2) qui vont pouvoir infecter des érythrocytes (3), donnant lieu à la formation d'un trophozoïte (4 et 5). Le trophozoïte va pouvoir soit donner lieu à un nouveau cycle de schizogonie permettant d'infecter de nouvelles cellules (6 et 7), soit s'engager dans la production des gamétocytes permettant la phase de reproduction sexuée (5' et 6'). Les gamétocytes mâles et femelles sont ingérés par le moustique où ils vont fusionner au niveau de l'intestin (7') et aboutir à la formation d'un oocyste (8'). C'est la phase de sporogonie. L'oocyste mature se rompt et libère des sporozoïtes (9') qui migrent jusqu'aux glandes salivaires du moustique et peuvent à nouveau infecter un nouvel hôte. Les stades affectés par la Monensine sont indiqués.

b- Bactériennes

La Monensine est active sur les bactéries Gram-positif uniquement. Elle agit essentiellement en entraînant un influx de protons accompagné d'un efflux de K^+ et d'un influx de Na^+ . Il a ainsi été observé chez la bactérie Gram-positif *Streptococcus bovis* que la Monensine entraîne une diminution du pH intracellulaire de 7,08 à 6,20 et une diminution de la concentration intracellulaire en ions K^+ de 613 mM à 134 mM (Russell,

1987). Afin de maintenir leur équilibre, les bactéries doivent se débarrasser de l'excédent de protons. Pour cela elles ont recours soit à un transport actif coûteux en ATP, soit à un transport passif à l'aide d'antiports Na^+/H^+ . La dépense énergétique engendrée entraîne la mort des bactéries ou un ralentissement important de leur croissance (Bergen & Bates, 1984).

c- Virales

i) Inhibition de l'entrée virale

Il a été montré que la Monensine est efficace contre un certain nombre de virus. De la même manière que de nombreux ionophores et comme nous l'avons vu précédemment, la Monensine est capable de bloquer l'étape d'entrée de certains virus lorsque celle-ci est dépendante du pH. Ainsi, il a été montré que la Monensine était capable de bloquer l'entrée du VSV (Schlegel *et al.*, 1981). De même, la Monensine inhibe l'entrée du SFV à une étape tardive intervenant après l'endocytose de la particule virale, probablement l'étape de fusion (Marsh *et al.*, 1982). Un effet sur la fusion a également été observé sur le Virus de la Maladie de Newcastle, un paramyxovirus infectant les oiseaux (Sánchez-Felipe *et al.*, 2014). Plus récemment, un effet similaire sur la fusion a été montré sur le virus du Chikungunya (Nuckols *et al.*, 2014).

ii) Inhibition de l'assemblage et de la sécrétion des particules virales

La Monensine est également capable d'agir sur les étapes tardives des cycles de réplication virale. En particulier elle est capable d'affecter l'assemblage d'un certain nombre de virus en bloquant le transport des glycoprotéines d'enveloppe virale et en affectant leur maturation post-traductionnelle. Ceci s'explique par l'effet de la Monensine sur le Golgi. En effet, l'addition de Monensine dans le milieu de culture cellulaire s'accompagne en quelques secondes d'un effet sur la physiologie du Golgi. Une dilatation des citernes du Golgi qui affecte le transport des protéines est alors observée. Ainsi, il a été montré que la présence de Monensine ralentit le transport de protéines normalement sécrétées tels que des protéoglycanes ou des glycoprotéines membranaires (Tartakoff, 1983). Il a également été montré, grâce à l'étude d'Ig

sécrétées, qu'en présence de Monensine, la maturation post-traductionnelle n'était pas achevée. Ainsi, il manque un galactose, un fucose et un acide sialique terminal à ces Ig qui n'acquièrent alors pas la résistance à l'endoglycosidase H (Tartakoff & Vassalli, 1979). De la même manière, de nombreux virus voient la maturation et le transport des protéines essentielles à la formation de particules virales infectieuses impactés par un traitement à la Monensine. Ainsi, la Monensine est capable de perturber les O-glycosylations et le transport de la glycoprotéine E2 du virus de la rougeole entraînant un défaut d'assemblage et de sécrétion du virus (Qiu *et al.*, 1995). Egalement, il a été montré que la Monensine affectait les glycosylations terminales de l'une des protéines d'enveloppe du virus Influenza, l'hémagglutinine, dont le transport à la membrane plasmique est réduit, réduisant d'autant l'assemblage et la sécrétion de particules virales. De manière intéressante des virions bourgeonnant au niveau du Golgi ont été observés, ce qui correspond aux membranes où les glycoprotéines d'enveloppe ont été accumulées au lieu de la membrane plasmique (Edwardson, 1984). De la même façon, la maturation de la glycoprotéine gp160, précurseur des glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 du HIV-1 est affectée par la Monensine. Ainsi, en présence de 1 μ M de Monensine, gp120 et gp41 ont des poids moléculaires plus faibles dûs à la perturbation de l'ajout des fucoses et galactoses terminaux (Dewar *et al.*, 1989). De même, le transport à la surface de la membrane plasmique des glycoprotéines d'enveloppe du VSV et du virus Sindbis est inhibé par la Monensine (Alonso & Compans, 1980; Johnson & Schlesinger, 1980).

2- La Monensine dans l'industrie agro-alimentaire

La Monensine A est l'un des sept ionophores polyéthers dont l'usage agricole a été approuvé à destination des élevages de volailles et de bovins essentiellement avec le lasalocide, la salinomycine, la narasine, la maduramycine, la laidlomycine ou encore la semduramycine. La Monensine, sous forme de sels complexée à des ions Na⁺, est distribuée dans ses différentes formulations commerciales sous forme de granules : Rumensin[®], Coban[®] ou Coxidin[®], pouvant être associée à différents minéraux selon les recettes commerciales.

a- Traitement des coccidioses

L'utilisation initiale de la Monensine, ainsi que des différents autres ionophores dans l'élevage de volailles (essentiellement les élevages de poulets et de dindes), a pour but de réduire l'occurrence et de traiter les coccidioses. Elle est utilisée à cet escent depuis les années 1970 (Ryley & Betts, 1973). Les coccidioses se caractérisent par des inflammations de la muqueuse intestinale, entraînant des diarrhées ainsi qu'un état fébrile. Ce sont des maladies dûes à certains parasites de la famille des *Eimeriidae* du phylum des Apicomplexa (Levine *et al.*, 1982). Les plus fréquemment impliqués chez les volailles sont les parasites *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* et *Eimeria tenella*. Le coût des pertes dûes à ces parasites est estimé à 2400 millions de dollars par an dans le monde (Shirley *et al.*, 2005). Ce sont des parasites qui infectent les cellules épithéliales de l'intestin et dont les oocystes se retrouvent dans les excréments, ce qui assure leur propagation par la voie fécale-orale.

La Monensine est efficace contre un large spectre d'espèces appartenant au genre *Eimeria* infectant les poulets : *Eimeria tenella*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mivati*, *Eimeria acervulima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria dispersa* ou encore *Eimeria brunetti* (Shumard & Callender, 1967; Watkins *et al.*, 1990). De plus, le fait que relativement peu de résistances sont développées par les parasites contre la Monensine, ainsi que le fait que la Monensine permette aux animaux traités de développer une immunité contre les parasites sans montrer de signes cliniques de coccidioses, font que cette molécule est aujourd'hui toujours utilisée (Chapman, 1984; 1999; Jeffers, 1978; Long *et al.*, 1979; Reid *et al.*, 1972). Afin de contourner les résistances qui peuvent se développer avec l'usage de Monensine ou d'autres ionophores, les élevages peuvent être traités par un vaccin dirigé contre les souches résistantes aux ionophores, avant que les animaux ne soient nourris avec des aliments auxquels est ajoutée la Monensine. C'est le cas du vaccin Nobilis® COX ATM qui contient des oocystes de parasites résistants aux ionophores (Shirley *et al.*, 2005).

b- Promoteur de croissance

De part ses effets antibactériens, la Monensine est capable de modifier la flore intestinale des bovins. En effet, la Monensine exerce une activité antimicrobienne

notamment contre les bactéries Gram-positif du genre *Clostridium*, en particulier les souches de *Clostridium perfringens*, qui représentent une part importante des bactéries de la flore intestinale des ruminants (Bolder *et al.*, 1999; Dutta & Devriese, 1984; Kondo, 1988; Watanabe *et al.*, 1981; Watkins *et al.*, 1997). Les modifications induites par la Monensine entraînent une prise de poids plus rapide dans ces élevages et seraient dues en partie au fait que cela rendrait les protéines plus facilement assimilables par l'organisme et empêcherait leur dégradation précoce dans le rumen. Ceci améliore la disponibilité des nutriments et favorise la rétention d'azote et de phosphore. Ainsi, les modifications engendrées par la Monensine dans la flore intestinale des ruminants améliorent à la fois le métabolisme énergétique et le métabolisme azoté (Bergen & Bates, 1984). Il a été montré également que la Monensine augmente la production d'acide propionique qui permet d'augmenter la synthèse de glucose et ainsi, de réorienter l'utilisation de l'hydrogène, autrement utilisé dans la production de méthane (Benz *et al.*, 1989).

Ceci a fait de la Monensine le premier promoteur de croissance non hormonal utilisé dans les élevages bovins (Goodrich *et al.*, 1984).

c- Autres utilisations

En plus de son utilisation dans le traitement des coccidioses et comme promoteur de croissance, la Monensine est également parfois utilisée dans les élevages bovins laitiers dans la prévention des cétooses qui peuvent survenir au moment du vêlage (Abe *et al.*, 1994; Sauer *et al.*, 1989; Van der Werf *et al.*, 1998). Les cétooses sont dues à un excès de corps cétoniques dans le sang dû à une utilisation excessive des graisses stockées par l'animal comme source énergétique. Les cétooses se traduisent par une fatigue importante de l'animal, des problèmes de reproduction ainsi qu'une perte des qualités organoleptique du lait. Comme vues auparavant, les modifications de la flore intestinale seraient à l'origine de l'effet de la Monensine sur les cétooses. Ainsi, la Monensine est capable de réduire le ratio d'acides gras volatiles dans le rumen et de diminuer les pourcentages molaires d'acides butyrique et acétique (Richardson *et al.*, 1976; Schelling, 1984). Or ces molécules sont impliquées dans la formation des corps cétoniques (**Figure 36**).

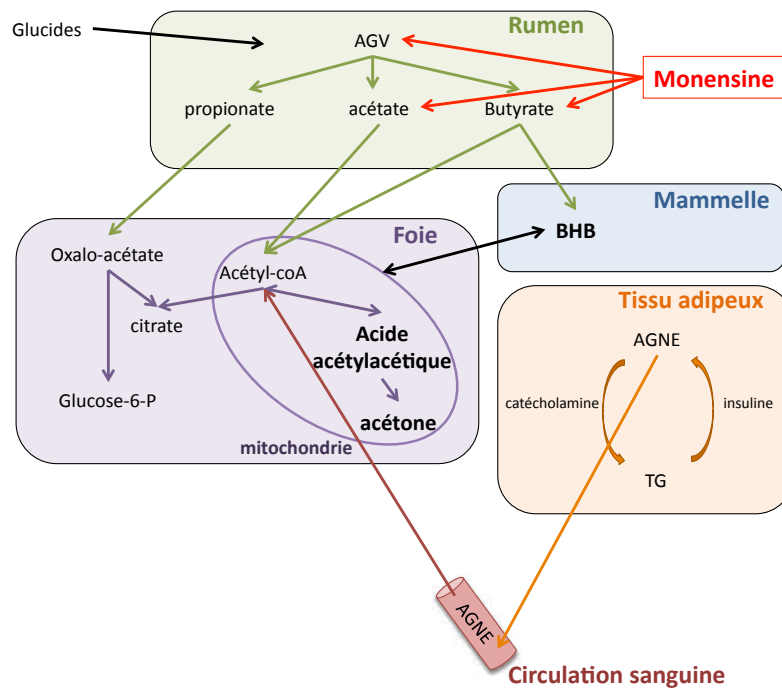


Figure 36 : Production des corps cétoniques chez la vache laitière et action de la Monensine.

Les corps cétoniques sont des métabolites secondaires issus du catabolisme des acides gras au niveau des mitochondries des hépatocytes mais également au sein de la paroi du rumen à partir d'acide butyrique principalement. L'acétyl-coA est le précurseur majeur des corps cétoniques (acide acétylacétique, acétone et β -hydroxybutyrate (BHB)) et est issu en partie de la dégradation des Acides Gras Non Estérifiés (AGNE) lorsque les stocks en glucides de l'organisme sont trop faibles. La Monensine en perturbant la flore bactérienne du rumen affecte les ratios de précurseurs de corps cétoniques (flèches rouges). Les corps cétoniques sont indiqués en gras (D'après Forgeat, 2013).

Il a également été montré que l'usage de Monensine pouvait augmenter la production de lait des vaches laitières (Hayes *et al.*, 1996; Lynch *et al.*, 1990). Cependant cet effet reste aujourd'hui controversé (Abe *et al.*, 1994; Lean *et al.*, 1994). Il semblerait que l'augmentation de la production de lait, qui peut parfois être observée, serait plutôt due à l'effet de la Monensine sur les cétozes. En effet, les cétozes entraînent une production de lait moindre et leur traitement est susceptible de contrer l'effet négatif des cétozes sur la production de lait.

La Monensine est également intéressante dans le contrôle des populations de mouches d'automne (*Musca autumnalis*) et de mouches des cornes (*Haematobia irritans*) dans les élevages bovins. Ainsi, les résidus de Monensine dans les excréments suffiraient à affecter leur développement, probablement en perturbant leur

morphogénèse via des dérèglements hormonaux (Boling *et al.*, 1977; Galewsky *et al.*, 1988; Herald & Knapp, 1980).

C- Les dérivés de Monensine

L'usage de la Monensine chez l'Homme est limité par sa toxicité. Elle est responsable d'empoisonnement notamment chez des agriculteurs. Une intoxication par la Monensine se traduit par une rhabdomyolyse aiguë, une faiblesse musculaire, ou encore, une insuffisance cardiaque (Caldeira *et al.*, 2001; Kouyoumdjian *et al.*, 2001). Bien que cette molécule soit utilisée couramment chez les volailles ou les bovins, sa toxicité est en effet très variable selon les espèces. Ainsi une dose de 33 mg/kg est suffisante pour empoisonner un cheval quand des doses allant jusqu'à plus de 125 mg/kg peuvent être utilisées chez les poulets (Novilla *et al.*, 1994). La dose létale 50 (LD50) a été estimée à 1,38 mg/kg chez les chevaux (Hanson *et al.*, 1981). Cette différence de toxicité est due aux différences suivant les espèces dans la métabolisation de la molécule.

La Monensine est prise en charge par le cytochrome p450 3A (Ceppa *et al.*, 1997; Nebbia *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2014), connu pour prendre en charge le métabolisme oxydatif d'un certain nombre de xénobiotiques. La métabolisation de la Monensine passe essentiellement par des O-déméthylations et des hydroxylations (Donoho *et al.*, 1978) ainsi que des décarboxylations (Donoho, 1984) donnant lieu à la production d'une cinquantaine de métabolites différents (Donoho, 1984), n'ayant pas ou peu d'effets toxiques comparés à la Monensine (Rocha *et al.*, 2014; Sassman & Lee, 2007). Des différences d'activité du cytochrome p450 3A expliquent, au moins en partie, les différences de toxicité de la Monensine d'une espèce à l'autre.

Pour ces raisons, et afin de pouvoir envisager un usage potentiel de la Monensine chez l'Homme, des dérivés de Monensine ont été synthétisés. Parmi eux, certaines molécules se sont révélées être très intéressantes. Ainsi, la Monensine méthyl-éther a une LD50 beaucoup plus élevée chez la souris (30 mg/kg) que la Monensine (8,5 mg/kg), tout en conservant une activité antimalariale, bien que légèrement moindre, avec une IC50 de 6,5 ng/ml contre une IC50 de 1,5 ng/ml pour la Monensine (Gumila *et al.*, 1997). Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* en testant la toxicité de la

Monensine méthyl-éther sur des lignées cellulaires de lymphocytes (Jurkat) et de macrophages (U937) (Gumila *et al.*, 1996).

	Ionophore	Bactéries		Champignons	Parasites	Virus	Cellules cancéreuses
		Gram+	Gram-				
Ionophores polyéthers	Monensin A	<i>Streptococcus</i> (Russell & Strobel, 1990), <i>Clostridium</i> (Silva <i>et al.</i> , 2009)	ND	<i>Candida albicans</i> , <i>Pneumocystis carinii</i> (Basselin-Eiweida & Kaneshiro, 2001; Pancaldi <i>et al.</i> , 1994)	<i>Plasmodium</i> , <i>Toxoplasma Gondii</i> , <i>Eimeria</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Neospora caninum</i> (Adovelande & Schrével, 1996; Couzinet <i>et al.</i> , 2000; Lindsay & Dubey, 1989; McDonald <i>et al.</i> , 1990)	HIV, virus de la rougeole, VSV, Virus Sindbis, influenza, SFV, HSV, SV40 (Alonso & Compans, 1980; Johnson & Schlesinger, 1980; Kohama <i>et al.</i> , 1986; Marsh <i>et al.</i> , 1982; Nakamura <i>et al.</i> , 1992; Wittels & Spear, 1991)	Cellules du cancer colorectal, Cellules de gliomes, cellules du cœur de la prostate, cellules carcinome rénal (Ketolal, 2010; Park <i>et al.</i> , 2009; Tumova <i>et al.</i> , 2014; Yoon <i>et al.</i> , 2013)
	Salinomycine	<i>Clostridium perfringens</i> (Kyriakis <i>et al.</i> , 1995)	<i>Salmonella</i> (Bolder <i>et al.</i> , 1999)	<i>Pneumocystis Carinii</i> (Cirioni <i>et al.</i> , 1998)	<i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Myxobolus</i> , <i>Henneguya</i> , <i>Eimeria Tenella</i> , <i>Toxoplasma Gondii</i> , <i>Plasmodium Falciparum</i> (Dohle <i>et al.</i> , 2002; Karagouni <i>et al.</i> , 2005; Mehlhorn <i>et al.</i> , 1983; Ricketts & Pfefferkorn, 1993; Steverding & Sexton, 2013)	HIV (Nakamura <i>et al.</i> , 1992)	Cellules cancéreuses de prostate, tumeurs mammaires, cellules cancéreuses ovariennes, cellules cancéreuses pancréatiques, cellules cancéreuses du colon (Fuchs <i>et al.</i> , 2010; Gupta <i>et al.</i> , 2009; He <i>et al.</i> , 2013b; Ketolal, 2012; Liffers <i>et al.</i> , 2013; Riccioni <i>et al.</i> , 2013; Zhang <i>et al.</i> , 2012).
	Lasalocide	<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Clostridium Perfringens</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus gallinarum</i> (Cobos <i>et al.</i> , 2011; Lauková <i>et al.</i> , 1995; Martel <i>et al.</i> , 2004)	<i>Escherichia Coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> (Edrington <i>et al.</i> , 2003)	<i>Sporothrix schenckii</i> (Alsina & Valle, 1984)	<i>Goussia carpelli</i> , <i>Cryptosporidiosis</i> , <i>Eimeria</i> (Molnár & Ostoros, 2007)	HIV (Nakamura <i>et al.</i> , 1992)	ND
	Nigéricine	<i>Staphylococcus Aureus</i> (Mandel <i>et al.</i> , 1983)	ND	<i>Candida Albicans</i> (Fang <i>et al.</i> , 2000)	<i>Plasmodium</i> (Adovelande & Schrével, 1996)	HIV, Vaccine, <i>Spumavirus</i> , <i>Poliovirus</i> , Influenza, VSV (Alonso-Caplen & Compans, 1983; Irurzun <i>et al.</i> , 1995; Myskiw <i>et al.</i> , 2010; Nakamura <i>et al.</i> , 1992; Picard-Maureau <i>et al.</i> , 2003)	Cellules de carcinome métastases du cancer colorectal nasopharyngé, cellules de carcinome pulmonaire ((Deng <i>et al.</i> , 2013; Zhou <i>et al.</i> , 2013)
	Calcimycine	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Brevibacillus laterosporus</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> (Haansuu <i>et al.</i> , 2001)	ND	<i>Phytophthora</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Heterobasidion annosum</i> , <i>Candida albicans</i> (Haansuu <i>et al.</i> , 2001; Walker <i>et al.</i> , 1984)	<i>Toxoplasma Gondii</i> , <i>Plasmodium Yoelii</i> (Arrizabalaga <i>et al.</i> , 2004; Tanabe & Doi, 1989)	VSV, virus Sindbis, HPAI (Johnson & Schlesinger, 1980; Klenk <i>et al.</i> , 1984; Onishi <i>et al.</i> , 1991)	ND

Tableau 3 : Propriétés antimicrobiennes et anticancéreuses des ionophores polyéthers.

	Ionophore	Bactéries		Champignons	Parasites	Virus	Cellules cancéreuses
		Gram+	Gram-				
Quasi-ionophores	Gramicidines	<i>Streptococcus, Staphylococcus, Clostridium pasteurianum, Bacillus subtilis, Clostridia welchii, Clavibacter histolyticum</i> (Ando <i>et al.</i> , 1983; Bryson & Drake, 1988; Gause & Brazhnikova, 1944)	<i>Shigella flexneri, Klebsiella pneumoniae, Salmonella abdominitis, Vibrio cholerae</i> (Ando <i>et al.</i> , 1983; Gause & Brazhnikova, 1944)	<i>Candida albicans</i> (Midez <i>et al.</i> , 1989)	<i>Babesia rodhaini, Theileria parva, Plasmodium</i> (McColm & McHardy, 1984)	HIV, HSV (Bourinbaïar & Coleman, 1997)	Cellules de carcinome (David <i>et al.</i> , 2014)
	Amphotéricine B	ND	ND	<i>Candida Albicans, Aspergillus, Cryptococcus neoformans</i> , (Furtado <i>et al.</i> , 1960; Huhtanen & Pensack, 1967; SPICKARD <i>et al.</i> , 1963)	<i>Leishmania, Plasmodium Berghei</i> (Midez <i>et al.</i> , 1989; Siraskar <i>et al.</i> , 2010)	ND	ND
Ionophores neutres	Valinomycine	<i>Streptococcus faecalis, Mycobacterium, Micrococcus lysodeikticus, Staphylococcus aureus, Clostridium sporogenes</i> (Ryabova <i>et al.</i> , 1975; Seshachalam <i>et al.</i> , 1973)	ND	<i>Candida albicans, Botrytis cinerea</i> (Park <i>et al.</i> , 2008; Watanabe <i>et al.</i> , 2005)	<i>Trypanosoma cruzi, Babesia gibsoni, Theileria parva, Plasmodium falciparum</i> (McColm & McHardy, 1984; Yamasaki <i>et al.</i> , 2009)	Poliovirus, PRRSV, SFV, SARS (Cheng, 2006; Helenius <i>et al.</i> , 1985; Irurzun & Carrasco, 2001; Karuppannan <i>et al.</i> , 2012; Wu <i>et al.</i> , 2004)	Cellules du carcinome colon (Ryoo <i>et al.</i> , 2014)
	Enniatines	<i>Enterococcus faecium, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus casei</i> (Sebastià <i>et al.</i> , 2011; Shin <i>et al.</i> , 2009)	<i>Yersinia enterocolitica, Shigella dysenteriae</i> (Sebastià <i>et al.</i> , 2011)	ND	ND	HIV (Shin <i>et al.</i> , 2009)	Carcinomes, leucémies, glioblastomes, ostéosarcomes, cellules cancéreuses pulmonaires, mélanome (Dornetshuber <i>et al.</i> , 2014)

Tableau 4 : Propriétés antimicrobiennes et anticancéreuses des ionophores neutres et des quasi-ionophores.

*Contexte et
objectifs des
travaux*

Partie 1 :**Identification et analyse fonctionnelle de variants de facteurs d'entrée du Virus de l'Hépatite C (HCV) retrouvés chez des patients très exposés mais non infectés par le HCV**

Puisqu'ils partagent les mêmes voies de transmission, le HCV et le HIV peuvent être fréquemment retrouvés de façon concomitante, en particulier chez les utilisateurs de drogues par voie intraveineuse (UDIV). En effet, la séroprévalence du HCV dans cette population peut atteindre 92,8 % contre 10 % dans une population de personnes homo- ou bi-sexuelles. Cette prévalence est de 41,7 % chez les hémophiles et/ou les personnes transfusées (Larsen *et al.*, 2008). Les multithérapies anti-HIV ont amélioré considérablement l'espérance de vie des patients infectés par le HIV. Ainsi, la co-infection HIV/HCV est devenue aujourd'hui une cause majeure de co-morbidité et de mortalité dans cette population. L'identification de facteurs protecteurs contre l'infection par l'hépatite C est donc d'une importance majeure. Du fait de la prévalence de l'infection par le HCV chez les personnes infectées par le HIV et UDIV (92.8 %), les sujets non infectés pourraient avoir une résistance génétique à l'infection par le HCV, par analogie avec ce qui existe pour le HIV, avec par exemple l'allèle $\Delta 32$ du co-récepteur CCR5 (Samson *et al.*, 1996). Ainsi, des facteurs génétiques de prédiction de l'évolution vers la chronicité et d'une meilleure réponse aux traitements anti-HCV ont été identifiés. Ces facteurs ont été décrits dans l'introduction. Cependant, aucune mutation particulière retrouvée naturellement dans des facteurs d'entrée, n'a été décrite à ce jour.

C'est pour quoi dans notre étude, des variants des gènes codant cinq des facteurs d'entrée du HCV (CLDN-1, -6 et -9, OCLN et SR-BI) dans une population de patients toxicomanes infectés par le HIV, très exposés au HCV mais non infectés, ont été recherchés. Dans cette cohorte, 122 sujets caucasiens ont fait l'objet d'une étude moléculaire complète des gènes codant ces cinq facteurs d'entrée, dont 100 sujets UDIV HIV⁺/HCV⁺ et 22 sujets HIV⁺/HCV⁻. Bien qu'aucun polymorphisme de CLDN-1 n'était spécifique de la population mono-infectée (Ghosn *et al.*, 2015), des variants faux sens de CLDN-6 et d'OCLN, non décrits dans les bases de données et non retrouvés dans la population contrôle, ont été identifiés. Ces variants étaient présents exclusivement chez un même sujet UDIV, HIV⁺/HCV⁻, hétérozygote pour ces deux gènes. L'entrée du HCV étant un phénomène multi-étapes, des combinaisons de variants moléculaires étaient à

envisager, qui par un phénomène de digénisme, pourraient accroître la résistance à l'infection par le HCV.

Ce travail a été initié par l'équipe du Pr. Micheline Misrahi du laboratoire de Génétique Moléculaire, pharmacogénétique et hormonologie de l'hôpital Bicêtre. C'est dans le cadre d'une collaboration avec M. Misrahi que nous avons été amenés à réaliser l'étude fonctionnelle des mutations identifiées.

Afin d'étudier la fonctionnalité de chacun de ces variants dans l'entrée du HCV, nous avons tout d'abord utilisé deux lignées cellulaires : les cellules 293T, qui n'expriment pas CLDN-1, -6 et -9 (Meertens *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007) et les cellules 786-O, qui expriment des niveaux trop faibles d'OCN pour être permissives à l'entrée des HCVpp (Ciesek *et al.*, 2011; Michta *et al.*, 2010; Ploss *et al.*, 2009). En surexprimant les variants dans ces lignées à l'aide de lentivecteurs, nous avons pu tester leur effet sur l'entrée des HCVpp.

Aucun effet n'ayant été observé dans ces conditions, nous avons co-exprimé ces variants dans des cellules Huh-7 et Lunet-hCD81 afin de tester leur effet dominant négatif sur l'entrée des HCVpp et la réplication des HCVcc. En effet, ces deux variants sont présents chez un patient hétérozygote pour ces deux gènes.

Enfin, comme aucun effet fonctionnel n'a pu être identifié, nous avons émis l'hypothèse que nos modèles cellulaires n'étaient potentiellement pas assez proches de ce qui se passait chez le patient. En effet, CLDN-6 et OCLN sont deux protéines de TJs, et nous avons vu au cours de l'introduction que la polarisation cellulaire des hépatocytes avait un impact important sur l'entrée virale (Harris *et al.*, 2013; Mee *et al.*, 2009; 2010). Pour ces raisons, nous avons d'une part utilisé un modèle de lignée cellulaire HepG2-CD81, capable de se polariser en formant une monocouche sur des transwells (Belouzard *et al.*, données non publiées) et d'autre part des hépatocytes primaires humains (PHHs). Cependant, aucun effet des deux variants sur l'infection par le HCV n'a pu être observé avec ces modèles.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'un article qui a dans un premier temps été soumis dans *Journal of Infectious Disease*. Un reproche majeur des reviewers venait du fait de l'absence d'analyse du polymorphisme de CD81 dans la cohorte de patients étudiée. Pour cette raison, la stratégie de publication est en train d'être revue. L'article est disponible dans la première partie des résultats :

Identification and functional analysis of variants of Hepatitis C Virus (HCV) entry factors found in patients highly exposed but not infected with HCV.

Lucie Fénéant, Jade Ghosn, Baptiste Fouquet, François Helle, Sandrine Belouzard, Thibaut Vausselin, Véronique Descamps, Jean-François Delfraissy, Jean Dubuisson, Micheline Misrahi, Laurence Cocquerel.

Partie 2 :**CD151, un organisateur moléculaire potentiel de l'entrée du HCV**

CD81, dont les rôles dans l'entrée, mais aussi plus récemment dans la réplication du HCV ont longuement été étudiés et caractérisés, est un membre de la superfamille des tétraspanines, qui sont des protéines membranaires que nous avons décrites au cours de l'introduction. Le laboratoire s'est beaucoup intéressé à l'étude d'EWI-2wint, une forme tronquée d'EWI-2, une protéine partenaire de CD81. Il a ainsi été montré que l'expression cellulaire de cette forme tronquée était non seulement capable d'inhiber l'infection, mais était en plus un facteur de tropisme négatif du HCV (Montpellier *et al.*, 2011; Potel *et al.*, 2013; Rocha-Perugini *et al.*, 2008). En effet, cette forme tronquée est exprimée dans de nombreux types cellulaires, mais pas dans les hépatocytes. Une étude récente, réalisée dans le laboratoire, a mis en évidence par des expériences de suivi de molécules uniques de CD81, que dans des cellules exprimant EWI-2wint, la diffusion membranaire de CD81 était réduite. En effet, l'association entre CD81 et EWI-2wint, induit un recrutement de CD81 au niveau de zones enrichies en CD81. Ainsi, le jeu d'interaction de CD81 avec ses partenaires influence sa répartition membranaire et sa clusterisation, qui a un impact direct sur sa diffusion membranaire, essentielle à une infection productive par le HCV (Potel *et al.*, 2013) (**Figure 37**).

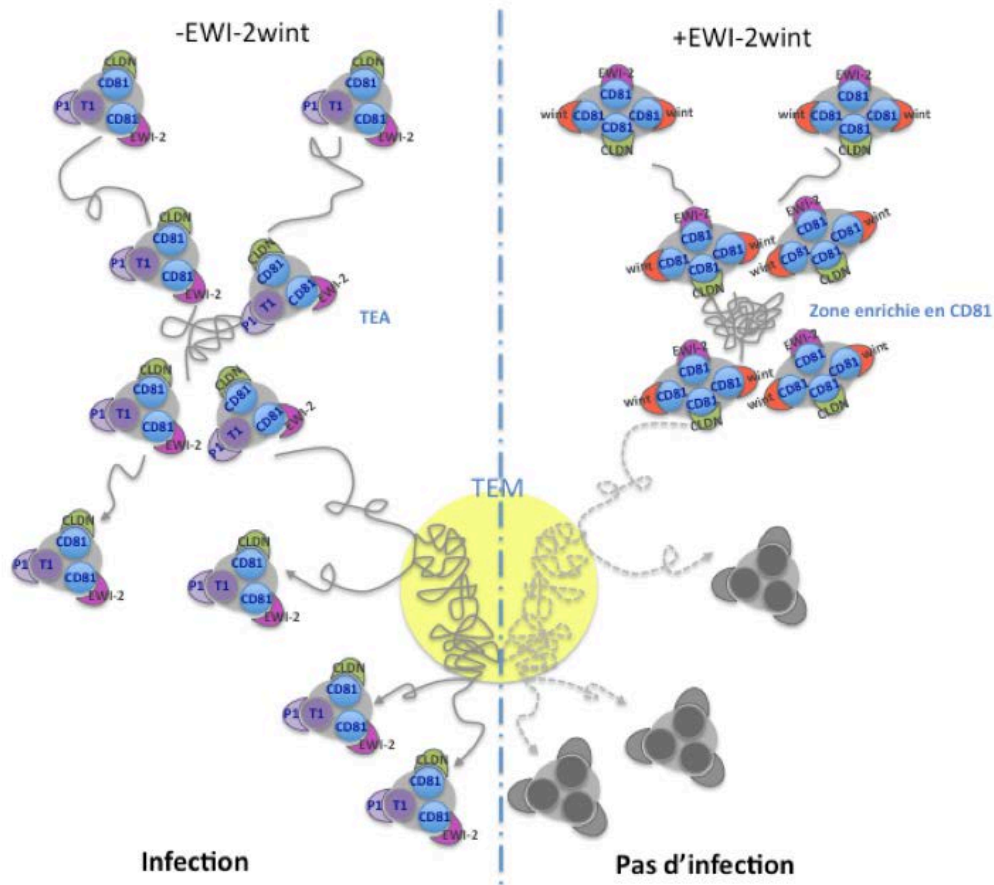


Figure 37 : Représentation de la dynamique membranaire de CD81 modulée par EWI-2wint.

Les tétraspanines (cercles) associées à leurs protéines partenaires (demi-cercles) diffusent sous forme de petits complexes. Ces complexes sont en échange perpétuel avec des zones enrichies en tétraspanines (TEAs), régions membranaires où leur diffusion est réduite. En l'absence d'EWI-2wint, cette association aux TEAs est temporaire. En présence d'EWI-2wint, les complexes contenant CD81 sont confinés dans des zones enrichies en CD81 où leur mobilité est réduite de façon durable (Potel, 2012).

Cette étude corrèle avec une autre étude récente, qui a montré qu'une mutation de la queue C-terminale de CD81 ou encore la polarisation de cellules HepG2-CD81, entraînaient non seulement une diminution de l'infection par le HCV, mais en plus étaient liés à une diminution de la mobilité membranaire de CD81 (Harris *et al.*, 2013).

Récemment, des études ont également suggéré qu'en dehors de CD81, les tétraspanines CD63 et CD151 pouvaient également être impliquées dans l'entrée du HCV (Park *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2012). Cependant, les mécanismes par lesquels ces deux tétraspanines régulent l'entrée du HCV sont encore inconnus.

L'identification de ces deux tétraspanines, combiné à l'importance de la dynamique membranaire de CD81, suggère que les tétraspanines pourraient avoir un

rôle d'organisateur membranaire dans l'entrée du HCV. C'est pourquoi, nous avons étudié l'implication dans l'infection par le HCV des différentes tétraspanines exprimées au niveau des hépatocytes, à savoir CD151, CD63, CD82, CD9 et Tspan8.

Comme nous l'avons introduit précédemment, CD151 serait potentiellement impliquée dans l'entrée du HCV. CD151 est une tétraspanine ayant été principalement décrite dans des tumeurs, dont les hépatocarcinomes. Elle est notamment impliquée dans des processus d'angiogenèse, de prolifération et de migration cellulaire (Sadej *et al.*, 2014). Une première étude s'intéressant au rôle des TEMs dans l'entrée du HCV a montré que la dépalmitoylation de CD81 impactait l'infection par le HCV et abolissait l'interaction entre CD81 et CD151. De plus, l'utilisation d'anticorps dirigés contre CD151 ainsi que le silencing de CD151, affectait aussi bien l'attachement de la particule virale que des étapes plus tardives de l'entrée du HCV (Zhu *et al.*, 2012). Par ailleurs, il a également été montré que CD151 était capable de réguler la stabilité de CLDN-1 à la surface cellulaire (Kovalenko *et al.*, 2007).

Plus récemment, une étude portant sur la recherche de nouveaux facteurs d'entrée du HCV par une approche de génomique intégrative, a permis de mettre en évidence la tétraspanine CD63. CD63 est une tétraspanine principalement exprimée dans les endosomes tardifs et les exosomes et régulant le transport intracellulaire des protéines (Pols & Klumperman, 2009). CD63 pourrait ainsi interagir directement avec la particule virale et, par un mécanisme inconnu, promouvoir l'infection par le HCV (Park *et al.*, 2013).

CD82 quant à elle, est essentiellement retrouvée dans les cellules épithéliales et les cellules du système immunitaire. Elle est connue pour avoir un rôle de suppresseur de tumeurs mais est également impliquée dans de très nombreuses fonctions biologiques telles que la migration cellulaire, l'adhésion, la morphogénèse ou encore l'apoptose (Tsai et Weissman, 2011). Il a été montré que CD82 modifiait la dynamique membranaire ainsi que la signalisation induite par l'EGF-R (Danglot *et al.*, 2010; Odintsova, 2003; Odintsova *et al.*, 2000), un facteur d'entrée du HCV (Lupberger *et al.*, 2011). Les études portant sur la régulation d'EGF-R par CD82 étant contradictoires, mais ayant été effectuées sur des modèles cellulaires différents par Odintsova et collaborateurs et Danglot et collaborateurs, des cellules mammaires HB2 et des cellules HeLa respectivement, il serait alors intéressant de savoir dans quel sens peut aller cette

régulation dans des cellules de type hépatocytaire et ainsi de connaître l'influence potentielle de CD82 sur l'infection par le HCV.

De façon similaire à CD82, CD9 est une tétraspanine impliquée dans la fusion et la migration cellulaire et est capable de moduler la signalisation induite par l'EGF-R. En effet, une étude a montré qu'une surexpression de CD9 entraînait une diminution de la voie de signalisation induite par l'EGF, avec notamment des différences dans le profil de phosphorylation des différents effecteurs de cette voie (Murayama *et al.*, 2008). CD9 est également associée à CLDN-1 et, de façon intéressante, cette association se fait essentiellement en dehors des jonctions serrées. CD9 participerait ainsi à la stabilisation de l'expression de CLDN-1 lorsque celle-ci se trouve en dehors des jonctions serrées (Kovalenko *et al.*, 2007). Or, de plus en plus d'études montrent que le HCV utiliserait lors de son entrée dans la cellule, le pool de CLDN-1 qui n'est pas associé aux jonctions serrées (Mee *et al.*, 2009; 2010).

Enfin, Tspan8 est une tétraspanine encore très peu caractérisée. Elle est notamment impliquée dans la progression métastatique et a été décrite dans les hépatocarcinomes (Guo *et al.*, 2012; Kanetaka *et al.*, 2001; Yue *et al.*, 2014). Elle interagit essentiellement avec les tétraspanines CD9 et CD151 (Zoller, 2009) et pourrait ainsi moduler indirectement l'entrée virale.

Nous avons ainsi émis l'hypothèse que ces différentes tétraspanines, en plus de CD81, pourraient avoir un rôle dans l'infection par le HCV. Ce rôle pourrait être indirect, en régulant l'organisation et l'expression membranaire des différents facteurs d'entrée nécessaires au HCV, ou alors direct en interagissant avec la particule virale.

Pour cela, nous avons réalisé des expériences de silencing des différentes tétraspanines ainsi que des expériences de neutralisation de l'infection par des anticorps anti-tétraspanines. Nous avons également généré des lentivecteurs permettant de surexprimer les différentes tétraspanines dans des cellules Huh-7. Nous avons aussi utilisé des formes solubles de la LEL des différentes tétraspanines afin de déterminer si le rôle que celles-ci pouvaient avoir dans l'infection était direct ou indirect.

CD151 étant une tétraspanine qui s'est révélée, dans notre étude, importante pour le HCV mais ayant probablement un rôle indirect, nous avons voulu évaluer

l'impact de CD151 sur la clusterisation de CD81 au sein des TEAs. Pour cela, nous avons utilisé des cellules Huh-7w7/mCD81 et les anticorps MT81 et MT81w, permettant de discriminer les molécules de CD81 murin associées ou non sous forme de clusters au sein des TEAs (Potel *et al.*, 2013). Des études par cytométrie en flux et par microscopie confocale ont permis de mettre en évidence que le niveau d'expression de CD151 à la surface cellulaire est capable de moduler le confinement de CD81 dans les TEAs.

Les résultats de ce travail sont présentés dans la deuxième partie des résultats :

CD151, un organisateur moléculaire potentiel de l'entrée du HCV.

Lucie Fénéant, Luise Florin, Fedor Berditchevski, Jean Dubuisson, Laurence Cocquerel.

Partie 3 :

Nouveaux éléments dans la compréhension de l'entrée et de la transmission cellule-cellule du Virus de l'Hépatite C grâce à l'utilisation de la Monensine A

La Monensine A est un ionophore polyéther issu de la fermentation de la bactérie *Streptomyces cinnamonensis*. Comme décrit plus avant dans l'introduction, la Monensine est une molécule capable de transporter essentiellement des cations monovalents et entraîne un influx d'ions Na⁺ et un efflux d'ions H⁺ au niveau des compartiments intracellulaires, notamment les endosomes ou encore le Golgi. L'action de la Monensine se traduit notamment par une alcalinisation des compartiments intracellulaires et une augmentation de la concentration en Ca²⁺ cytosolique. Ses différentes propriétés en font une molécule efficace contre de nombreux pathogènes, notamment des bactéries Gram-positif, des parasites du groupe Apicomplexa, ainsi que de nombreux virus. Ainsi, la Monensine inhibe par exemple l'entrée du SFV en bloquant son étape de fusion (Marsh *et al.*, 1982) ou encore inhibe l'assemblage et la sécrétion du HIV en affectant la maturation des glycoprotéines d'enveloppe au niveau du Golgi (Dewar *et al.*, 1989).

Pour ces raisons, nous avons voulu étudier le potentiel antiviral de la Monensine sur le HCV.

La molécule étant effectivement active contre le HCV, nous avons cherché à caractériser l'étape du cycle bloqué par la Monensine. Des études de cinétique ont permis de montrer que celle-ci inhibait une étape tardive de l'entrée du HCV, et ce de manière pangénotypique. Afin de savoir si c'était l'étape d'endocytose dépendante de la clathrine qui était en cause (Blanchard *et al.*, 2006), nous avons utilisé des virus contrôles, l'adénovirus 5 (AdV5) et le Virus Coxsackie B4 (CBV4), qui utiliseraient cette voie d'entrée (Suomalainen *et al.*, 2013). L'absence d'effet de la Monensine sur ces deux virus suggérait donc un effet sur l'étape de fusion dépendante du pH. Pour vérifier cela, nous avons utilisé de l'acridine orange, une molécule qui fluoresce de façon différentielle selon le pH. Ces résultats ont permis de montrer que la Monensine bloquait vraisemblablement la fusion de la particule virale.

Nous avons également réalisé un test de transmission cellule-cellule en utilisant des anticorps neutralisants, empêchant l'infection de nouvelles cellules via la sécrétion

de nouveaux virions, en présence de Monensine. Ceci a montré que la transmission cellule-cellule était un processus dépendant du pH. Ce résultat a été confirmé en utilisant de la chloroquine, une autre molécule connue pour modifier le pH intracellulaire.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'inhibition de l'infection par le HCV, nous avons généré des mutants de résistance à la Monensine. Pour cela, nous avons infecté des cellules Huh-7 avec des HCVcc et nous avons récolté régulièrement les surnageants pour infecter de nouvelles cellules en présence de concentrations croissantes de Monensine. Nous avons ainsi généré une population virale résistante à la Monensine, au sein de laquelle nous avons isolé par extraction d'ARN, suivie de PCR sur les protéines structurales et clonage, un clone résistant. L'étude de ce clone a révélé que deux mutations, Y297H dans E1 et I399T dans la région HVR1 de E2, conféraient la résistance observée.

Afin de caractériser l'effet de ces deux mutations sur la conformation de E1 et E2, nous avons réalisé des tests de neutralisation avec des anticorps conformationnels des glycoprotéines d'enveloppe, ainsi qu'avec des anticorps ciblant CD81. Nous avons également étudié la densité des particules virales générées par ultracentrifugation sur gradient d'iodixanol.

L'impact des mutations sur la conformation de E2 et le fait que les particules virales présentaient une densité plus importante que les particules produites par la souche sauvage, nous ont amené à étudier l'effet des mutations Y297H et I399T sur l'incorporation d'ApoE dans les particules virales. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de neutralisation avec des anticorps anti-ApoE, qui ont révélé une plus grande sensibilité du mutant I399T à la neutralisation.

Enfin, les mutants générés étant partiellement indépendants du pH et utilisant probablement une voie d'entrée différente de celle empruntée par le virus sauvage, nous avons ensuite analysé si ces mutants se transmettaient toujours directement de cellule à cellule. Par une approche semblable à la précédente, nous avons montré que nos mutants, et plus particulièrement le mutant I399T, ne se transmettaient plus de cellule à cellule.

Les résultats de ce travail sont présentés dans la troisième partie des résultats et sont actuellement en révision dans *Journal of Virology* :

New insights into the understanding of hepatitis C virus entry and cell-to-cell transmission by using ionophore Monensin A

Lucie Fénéant, Julie Potel, Catherine François, Famara Sané, Florian Douam, Sandrine Belouzard, Noémie Calland, Thibaut Vausselin, Yves Rouillé, Véronique Descamps, Thomas F. Baumert, Gilles Duverlie, Dimitri Lavillette, Didier Hober, Jean Dubuisson, Czeslaw Wychowski, Laurence Cocquerel

Résultats

Partie 1:

*Identification and functional analysis
of variants of Hepatitis C Virus
(HCV) entry factors found in patients
highly exposed but not infected with
HCV*

Manuscript

[Click here to download Manuscript: LF-MS2-JID-12-08-14.docx](#)

1 **Identification and functional analysis of variants of Hepatitis C Virus (HCV) entry**
2 **factors found in patients highly exposed but not infected with HCV**

3

4 Fénéant L.^{a*}, Ghosn J.^{b, c*}, Fouquet B.^d, Helle F.^e, Bélouard S.^a, Vausselin T.^a, Séron K.^a,
5 Descamps V.^e, Delfraissy J-F.^b, Dubuisson J.^a, Cocquerel L.^{a&} and Misrahi M.^{d&}

6

7 Running title: Variants of HCV receptors and infection

8

9 ^a Hepatitis C Laboratory, Center for Infection and Immunity of Lille, University Lille Nord de
10 France, CNRS UMR8204, INSERM U1019, Pasteur Institute of Lille, Lille, France

11 ^b Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, Centre Hospitalier Universitaire de
12 Bicêtre, APHP, Le Kremlin-Bicêtre, France.

13 ^c Université Paris Descartes, EA 7327, Faculté de Médecine site Necker, Paris, France.

14 ^d Université Paris Sud, Faculté de Médecine, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.

15 ^e Virology Department, Amiens University Hospital, Amiens, France.

16 * These authors have contributed equally

17 & These senior authors have contributed equally

18 Correspondence should be addressed to:

19 Dr. L. Cocquerel, CIIL (HCV), Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Pr Calmette CS50447,
20 59021 Lille, France. Phone: (33) 3 20 87 11 62 Fax: (33) 3 20 87 12 01 Email:

21 laurence.cocquerel@ibl.cnrs.fr

22 Alternative corresponding author: Pr. M. Misrahi, Faculté de Médecine Paris Sud, Hôpital
23 Bicêtre, 63 rue Gabriel Péri, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France. Phone : (33) 6 76 07 04 81

24 Email: mabadou@numericable.fr

25

26 **Footnotes**

27 (1) Authors have no conflict of interest

28 (2) This work was supported by the French National Agency for Research on AIDS and Viral
29 Hepatitis (ANRS) (grants ANRS AO-1-2008 and ANRS AO-2-2013) and by grants from
30 Roche laboratories (Dr. Alexandrina Pinta) and Janssen laboratories (Dr. Rima Lahoulou).
31 The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or
32 preparation of the manuscript.

33 (3) Correspondence and request for reprints should be addressed to:

34 Dr. L. Cocquerel, CIIL (HCV), Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Pr Calmette CS50447,
35 59021 Lille, France. Phone: (33) 3 20 87 11 62 Fax: (33) 3 20 87 12 01 Email:
36 laurence.cocquerel@ibl.cnrs.fr

37 Alternative corresponding author: Pr. M. Misrahi, Faculté de Médecine Paris Sud, Hôpital
38 Bicêtre, 63 rue Gabriel Péri, 94275, Le Kremlin-Bicêtre, France. Phone : (33) 6 76 07 04 81
39 Email: mabadou@numericable.fr

40 (4) New affiliation for T. Vausselin: Department of Microbiology, Icahn School of Medecine
41 at Mount Sinai, New York, NY, USA

42 (5) New affiliation for J Ghosn: Unité Fonctionnelle de Thérapeutique en Immuno-
43 Infectiologie, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel-Dieu, Paris, France

44

45 **Abstract** (100 words)

46

47 The very high prevalence of HCV in HIV-infected intravenous drug users (IVDU) suggests
48 that HIV-infected IVDU who are HCV-negative might have genetic factors conferring
49 protection against HCV. We conducted a case-control study in such a population to identify
50 potential mutations in HCV entry factors (Claudins, Occludin and Scavenger Receptor SR-
51 BI). Interestingly, 18% of case patients had specific variants. Three had mutations or a rare
52 variant of SR-BI, whereas another one interestingly harbored both a mutation in Claudin-6
53 and a rare Occludin variant. Functional studies were performed *in vitro*, and our results
54 suggest a high complexity in HCV resistance *in vivo*.

55

56 Key words: Hepatitis C Virus, entry factors, Claudin-6, Claudin-9, Occludin, SR-BI, variants,
57 SNP, infection, genetic resistance

58

59 **Text** (1997 words)

60

61 Hepatitis C Virus (HCV) infection is a global public health problem affecting over 160
62 million people worldwide (1). As HCV and HIV share the same transmission routes, they are
63 frequently found concomitantly, particularly in highly exposed populations such as HIV-
64 infected intravenous drug users (IVDU), where HCV seroprevalence reaches 92.8% (2). Thus,
65 being HCV-free while having acquired HIV-1 via intravenous drug use is a rare situation.

66 HCV is a small enveloped virus that infects hepatocytes by interacting with a series of
67 specific cellular factors including the tetraspanin CD81 (3), the Scavenger Receptor BI (SR-
68 BI) (4) and the tight junction proteins Claudin-1 (CLDN1) (5) and Occludin (OCLN) (6).
69 Two other tight junction proteins, CLDN6 and CLDN9, were described as cofactors that HCV
70 can use instead of CLDN1 in certain cell types (7). Additional entry factors have been more
71 recently described but their exact role in HCV entry still needs to be investigated (8,9).

72 Here, we conducted a case-control study to determine whether mutations in some
73 HCV entry factors could be specifically identified in highly exposed but HCV negative
74 patients. This would be a first step towards understanding the role of these cellular factors in
75 the HCV negative phenotype of these patients. We also performed functional studies *in vitro*
76 of two combined variants in different entry factors found in the same patient.

77

78 **METHODS**

79 Material and methods are available in the supplementary data.

80

81 **RESULTS**

82 As described previously (10), we recruited 138 Caucasian patients having acquired
83 HIV-1 infection before 1995 through intravenous drug use (at least five years of drug
84 injection). Cases (n=22) were defined as HIV-1 infected IVDU remaining HCV negative after

85 a minimum period of five years of intravenous drug use (negative for HCV antibodies and
86 RNA). Controls (n=116) were defined as HIV-1 infected IVDU co-infected with HCV
87 (positive anti-HCV antibodies).

88

89 **Sequencing of *CLDN6*, *CLDN9*, *OCN* and *SR-BI* genes.**

90 In a previous study on the *CLDN1* gene, we did not identify any specific coding
91 variant in the case population (10). Here, direct genomic sequencing of the whole coding
92 region and adjacent intron-exon junctions of *CLDN6*, *CLDN9*, *OCN* and *SR-BI* genes
93 performed in both populations enabled us to identify several new mutations and single
94 nucleotide polymorphisms (SNPs).

95 In *CLDN6* gene, we found SNPs in both populations, corresponding to frequent
96 polymorphisms described in conventional databases (NCBI and 1000 Genomes databases)
97 (**Supplementary Table 1**). However, one SNP rs149605777 (**Table 1**) corresponding to a
98 c.626G>A heterozygous coding variant was found only in the HIV+HCV- case population
99 (G>A n=1) but not in the HIV+HCV+ controls. This leads to a missense Arg209Gln (R209Q)
100 change in the C-terminal cytosolic tail of CLDN6 (**Figure 1A**), with non-attributed MAF
101 (minor allele frequency) in NCBI database. Prediction tools (PolyPhen 2 and SIFT) showed
102 that this mutation is possibly damaging (scores of 0.533 with PolyPhen and 0.43 with SIFT).
103 The Human Splicing Finder (HSF) software showed that this c.626G>A substitution
104 potentially creates a splice acceptor site. However, sequencing of cDNAs derived from the
105 patient's blood cells mRNAs showed no evidence of splicing *in vivo* (**Supplementary**
106 **material**).

107 In *CLDN9* gene, we identified SNPs already described in databases (**Supplementary**
108 **Table 1**). There was no statistical difference between control and case populations.

109 In *OCN* gene, we identified several SNPs with one rare heterozygous variant found

110 exclusively in the case population and not in controls (**Supplementary Table 1**). This
111 rs147125035 rare variant present in only one HIV+HCV- patient corresponds to a missense
112 c.70C>G substitution with a MAF frequency of 0.006. It leads to a Pro24Ala (P24A) change
113 (**Table 1**) in the N-terminus of OCLN (**Figure 1A**). This variant is predicted to be potentially
114 damaging (scores of 1 with PolyPhen and 0.12 with SIFT). Interestingly, this rare variant was
115 found in the same case patient who displayed the CLDN6 mutation described above. Both
116 residues mutated in CLDN6 and OCLN are highly conserved in different species.

117 We also identified three specific variants of the *SR-BI* gene in the HIV+HCV-
118 population (**Supplementary Table 1; Table 1**): rs5891 (MAF: 0.007) and rs372663606 (no
119 attributed MAF in NCBI), corresponding to heterozygous c.403G>A missense (leading to a
120 p.Val135Ile change) and c.1056G>A synonymous (p.Pro352) substitutions, respectively. An
121 unprecedentedly described NC+23C>T heterozygous substitution in the third exon of *SR-BI*
122 gene, encoding the 3' non-coding sequence, was also found. No splice site was found for these
123 mutations using the HSF software. The missense substitution is predicted to be benign (scores
124 of 0.322 with PolyPhen and 0.5 with SIFT).

125 Together, we found for the first time in a HIV+HCV- IVDU population that 18% of
126 the case patients displayed specific mutations or variants of HCV cellular receptors.
127 Interestingly one patient harbored two variants of different cellular factors required for HCV
128 entry. These residues are highly conserved in different species and likely damaging. One
129 mutation has no frequency described in databases, the other variant being rare and notably not
130 found in the control population. This led us to conduct *in vitro* functional studies to know
131 whether the identified variants in two factors necessary for HCV entry might be involved in
132 the HCV negative phenotype.

133

134

135 **Functional studies of CLDN6 and OCLN variants**

136 To analyze the functionality of CLDN6 and OCLN variants in HCV infection, we first
137 generated lentivectors expressing CLDN6/wt or CLDN6/R209Q and lentivectors expressing
138 OCLN/wt and OCLN/P24A fused to GFP. We used these lentivectors to transduce 293T, 786-
139 O and TZM cell lines, which become permissive to HCV infection when they ectopically
140 express CLDN6 and/or OCLN (**Supplementary Material**). However, expression of
141 CLDN6/R209Q in 293T cells (**Supplementary Figure 1A-1E**), OCLN/P24A in 786-O cells
142 (**Supplementary Figure 1F-1J**) or the combined expression of these variants in TZM cells
143 (data not shown) did not show any detectable effect on HCV entry.

144 Since the patient is a compound heterozygous for both CLDN6 and OCLN variants,
145 we next hypothesized that a dominant negative effect could be observed. Therefore, we
146 overexpressed wt or mutant CLDN6 and OCLN in hepatoma Huh-7 cells that endogenously
147 express CLDN-1, -6 and OCLN proteins. After controlling cell surface expression (**Figure 1B**
148 **and 1C**), cells were infected with HCVpp from two different genotypes (1a and 2a) or
149 HCVcc, which enable to analyze the entry step or the whole HCV lifecycle, respectively.
150 However, permissiveness of Huh-7 cells was not affected by the CLDN6 and OCLN
151 mutations (**Figure 1D**). Long-term expression of mutants (3 weeks) in Huh-7 cells before
152 infection did not affect either their permissiveness to HCVpp and HCVcc (data not shown).
153 Moreover, the change of incubation time or multiplicity of infection (m.o.i.) during viral
154 inoculation did not show either a significant effect of mutants on HCVcc infection levels
155 (**Supplementary Figure 2A and 2B**).

156 In order to exclude a potential effect of CLDN6 and OCLN variants on cellular
157 functions, we also expressed them in Huh-7-Lunet-hCD81-FLuc cells, which endogenously
158 express the *Firefly*-luciferase reporter gene (11). Like before, the mutants did not affect the
159 permissiveness of Lunet cells to HCVcc infection (**Figure 1E**).

160 Additional experiments performed showed that mutations have no effect on HCV
161 replication and assembly (data not shown).

162 HCV entry can occur either through newly secreted virions or directly through cell-to-
163 cell transmission, in which tight junction proteins are likely involved. The characterization of
164 CLDN6 and OCLN mutations in HCVcc (expressing structural proteins from genotype 2a or
165 3a) cell-to-cell transmission did not show any effect (**Supplementary Figure 2C and 2D**).

166 CLDN6 and OCLN are tight junction proteins, which are important in cellular
167 polarization that regulates CD81 membrane diffusion and HCV infection (12). Therefore, we
168 hypothesized that the mutation effects might only be observed in polarized cells. We
169 transduced and infected HepG2-CD81-1SC3 cells, a cellular clone that polarizes in the
170 presence of DMSO. Quantification of HCVcc infection levels by qRT-PCR showed no
171 difference in the number of HCV RNA copies between polarized cells expressing wt or
172 mutated forms of CLDN6 and OCLN (**Figure 1F**).

173 Finally, we assessed the effect of mutations in primary human hepatocytes (PHHs), the
174 most physiologically relevant model to investigate HCV infection *in vitro*. Transduced PHHs
175 expressing YFP, wt or mutated CLDN6 and OCLN proteins were infected with HCVcc or
176 inactivated virus. Quantification of intracellular HCV RNAs showed that HCVcc efficiently
177 infected PHHs compared to the inactivated virus. However, we did not observe any detectable
178 effect of CLDN6/R209Q and OCLN/P24A expression on PHHs permissiveness (**Figure 1G**).

179

180 **DISCUSSION**

181 The seroprevalence of HCV is around 24 % in HIV-infected patients. However, this
182 seroprevalence can be very different, depending on the population studied. Seroprevalence
183 reaches less than 10% for homo- and bi-sexual patients, 41.7% for hemophilic and transfused
184 patients, and 92.8% for IVDU (2). Therefore, HIV-infected patients who acquired HIV via

185 intravenous drug use and remained uninfected by HCV can be considered as extremely rare,
186 as observed in another study based on patients enrolled in the Urban Health Study (13). In
187 addition, we selected individuals with documented and prolonged exposure to HCV (at least
188 five years of IVDU) and with a HIV-1 infection diagnosed before 1995, in order to avoid
189 false resistance to HCV infection. We therefore considered that the HCV-negative patients
190 that we enrolled in our study were very likely resistant to HCV infection since they had
191 normally been exposed to HCV over several years, even if we cannot totally exclude the
192 remote probability that some of them have not been exposed to HCV.

193 In our study, we explored the possibility that variants in HCV cell entry factors might
194 be involved in resistance to HCV infection. We sequenced the genes of four entry factors in a
195 population of HIV-infected IVDU at high risk of HCV infection but not infected. In contrast
196 to our previous study on CLDN1 (10), we identified variants in CLDN6, OCLN and SR-BI
197 that were found only in 18% of the case population and not in controls. Interestingly, in the
198 same case patient, we found one heterozygous mutation in CLDN6, and one rare
199 heterozygous variant in OCLN, both likely damaging and involving residues highly conserved
200 in different species. The probability to have both variants in a same case patient is extremely
201 unlikely. This demonstrates that in our case population, combination of new mutations or rare
202 variants can be specifically found and suggests that HCV resistance might be a polygenic
203 mechanism. We conducted functional *in vitro* studies of CLDN6 and OCLN variants found in
204 the same case patient to define whether they could be involved in resistance mechanisms. We
205 analyzed the functionality of CLDN6-R209Q and OCLN-P24A in HCV entry. The use of
206 different cellular models did not allow to detect any impact of the mutations on HCV
207 infection. However, they do not necessarily reflect *in vivo* events in the patient since
208 interaction with other factors is predicted to occur *in vivo*. The use of humanized mice might
209 be a more valuable model to study the functional impact of these mutations *in vivo*. Indeed,

210 we cannot exclude that these variants found in the same patient might confer protection to
211 HCV infection *in vivo*. Moreover, it has recently been suggested that although CLDN6 and
212 CLDN9 can serve as entry factors in cell lines, HCV infection into human hepatocytes is not
213 dependent on CLDN6 and CLDN9 expression (14). Since CLDN6 is mainly expressed in
214 lymphoid cells, it might be involved in the establishment and persistence of HCV infection in
215 these cells. CLDN6/R209Q might be defective in these processes. Since HCV entry is a
216 complex and multistep process, variants in other entry factors might also be necessary in
217 combination with those we have identified, to affect HCV entry. Finding additional mutations
218 in SR-BI not detected in databases or rare variants specific of our case population strongly
219 reinforces this hypothesis.

220 In conclusion, we report for the first time, specific mutations in HCV entry factors
221 found in 18% of highly exposed but HCV negative patients. Our studies highlight the
222 complexity of *in vivo* mechanisms of HCV resistance and entry. The absence of negative
223 dominance *in vitro* offers a unique opportunity to discuss the intricacy of *in vivo*
224 physiopathology of mutations in HCV co-receptors, probably through interactions with not
225 yet identified partners. Thus, whole genome studies should prove to be promising to identify
226 the different cellular factors implicated in HCV resistance.
227

228 FUNDING:

229 This work was supported by the French National Agency for Research on AIDS and
230 Viral Hepatitis (ANRS) (grants ANRS AO-1-2008 and ANRS AO-2-2013) and by grants
231 from Roche laboratories (Dr. Alexandrina Pinta) and Janssen laboratories (Dr. Rima
232 Lahoulou). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to
233 publish or preparation of the manuscript. L. F. was supported by a fellowship from the French
234 Ministry of Research.

235

236 CONFLICT OF INTEREST:

237 The authors have no conflict of interest.

238

239 ACKNOWLEDGMENTS

240 We thank all the patients who participated in the study as well as study nurses in the
241 four participating centers. We are grateful to Jennifer Martret, Olivier Alibeu and Sophana
242 Ung for their technical assistance. We are also thankful to Allison Smither for critical reading
243 of the manuscript and Marie Verbanck for the statistical analyses on the cohort.

244

245

246

247

248 **REFERENCES**

- 249 1. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical Microbiology and Infection*. **2011**; 17(2):107–115.
- 251 2. Larsen C, Pialoux G, Salmon D, Antona D, Le Strat Y, Piroth L, et al. Prevalence of
252 hepatitis C and hepatitis B infection in the HIV-infected population of France,
253 2004. *Euro Surveill*. **2008**; (22):13.
- 254 3. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of
255 hepatitis C virus to CD81. *Science*. **1998**; 282(5390):938–941.
- 256 4. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, et al. The
257 human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the
258 hepatitis C virus. *EMBO J*. **2002**; 21(19):5017–5025.
- 259 5. Evans MJ, Hahn von T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, et al. Claudin-1 is a
260 hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. **2007**;
261 446(7137):801–805.
- 262 6. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, De Jong YP, et al. Human
263 occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells.
264 *Nature*. **2009**; 457(7231):882–886.
- 265 7. Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, et al. Claudin-6 and claudin-9 function as
266 additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol*. **2007**; 81(22):12465–12471.
- 267 8. Lupberger J, Zeisel M-B, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, et al. EGFR and
268 EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral
269 therapy. *Nat Med*. **2011**; 17(5):589–595.
- 270 9. Sainz B, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, et al.
271 Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a
272 new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med*. **2012**; 18(2):281–285.
- 273 10. Ghosn J, Alibeu O, Sahali S, Quertainmont Y, Meyer L, Salmon D, et al. Claudin-1
274 gene variants and susceptibility to Hepatitis C infection in HIV-1 infected
275 intravenous drug users (an ANRS case-control study). *Journal of Hepatology*.
276 **2012**; 56:S347.
- 277 11. Gentzsch J, Hinkelmann B, Kaderali L, Irschik H, Jansen R, Sasse F, et al. Hepatitis C
278 virus complete life cycle screen for identification of small molecules with pro- or
279 antiviral activity. *Antiviral Research*. **2011**; 89(2):136–148.
- 280 12. Harris HJ, Clerte C, Farquhar MJ, Goodall M, Hu K, Rassam P, et al. Hepatoma
281 polarization limits CD81 and hepatitis C virus dynamics. *Cell Microbiol*. **2013**;
282 (3):430–445.
- 283 13. Bekker V, Chanock SJ, Yeager M, Hutchinson AA, Hahn von T, Chen S, et al. Genetic
284 variation in CLDN1 and susceptibility to hepatitis C virus infection. *Journal of Viral
285 Hepatitis*. **2010**; 17(3):192–200.

- 286 14. Fofana I, Zona L, Thumann C, Heydmann L, Durand SC, Lupberger J, et al.
287 Functional analysis of claudin-6 and claudin-9 as entry factors for hepatitis C virus
288 infection of human hepatocytes by using monoclonal antibodies. *J Virol.* **2013**;
289 87(18):10405-10410.
- 290 15. Helle F, Brochot E, Fournier C, Descamps V, Izquierdo L, Hoffmann TW, et al.
291 Permissivity of primary human hepatocytes and different hepatoma cell lines to
292 cell culture adapted hepatitis C virus. *PLoS ONE.* **2013**; 8(8):e70809.
- 293

294 **Table 1: Variants of HCV entry factors specific of the case population**

Gene	CLDN6	OCLN	SR-BI	SR-BI	SR-BI
dbSNP ^a	c.626 G>A	c.70 C>G	c.403 G>A	NC+23 C>T	c.1056 G>A
Exon	1	3	3	3	8
Amino acid position	p.Arg209Gln	p.Pro24Ala	p.Val135Ile	NA ^b	p.Pro352
Function	missense	missense	missense		synonymous
Prediction score PolyPhen	0.533	1.000	0.322		NA
Prediction score SIFT	0.43	0.12	0.50		NA
Potential splice site HSF	acceptor site	no site	no site		no site
Database	NCBI	1000 Genomes	1000 Genomes	-	NCBI
dbSNP rs#ID ^c	rs149605777	rs147125035	rs5891	NA	rs372663606
MAF ^d	NA	0.006	0.007	NA	NA
IVDU ^e HIV+HCV+ N=116	0	0	0	0	0
IVDU HIV+HCV- N=22	G>A n=1	C>G n=1	G>A n=1	C>T n=1	G>A n=1

295
 296 ^a Database single nucleotide polymorphism
 297 ^b Non attributed
 298 ^c refSNP
 299 ^d Minor allele frequency
 300 ^e Intravenous drug users
 301
 302

303

304

305 **FIGURE LEGENDS**

306

307 **Figure 1: Expression of CLDN6/R209Q and OCLN/P24A mutants in hepatic cells and**
308 **analysis of their functionality in HCV infection.**

309 (A) Schematic representation of CLDN6 and OCLN and position of R209Q and P24A
310 mutations in CLDN6 and OCLN, respectively. (B-G) Cell lines or primary human
311 hepatocytes (PHH) were sequentially transduced twice at 24h interval with lentivectors
312 expressing CLDN6/wt or CLDN6/R209Q and/or OCLN/wt or OCLN/P24A. Two days after
313 the last transduction round, protein expression was controlled and cells were infected. (B)
314 Expression in transduced Huh-7 cells. Upper panel, CLDN6/wt and CLDN6/R209Q cell
315 surface expression was measured by flow cytometry using an anti-CLDN6 mAb, and
316 compared to that of untransduced Huh-7 cells (Huh-7 Mock). Cells stained with secondary
317 antibodies were used as negative controls (dashed line). Lower panel, GFP-tagged OCLN/wt
318 and OCLN/P24A expression in Huh-7 cells was estimated through the percentage of GFP
319 positive cells by flow cytometry analysis. Huh-7 Mock were used as negative controls
320 (dashed line). (C) CLDN6/wt and CLDN6/R209Q expression in Huh-7 cells was verified by
321 indirect immunofluorescence using an anti-CLDN6 mAb. Cell surface expression of GFP-
322 tagged OCLN/wt and OCLN/P24A in Huh-7 cells was determined by fluorescent microscopy.
323 (D) Transduced Huh-7 cells were infected with HCVpp1a, HCVpp2a or VSVpp, expressing
324 the *Firefly*-luciferase reporter gene, or HCVcc2a expressing the *Gaussia*-luciferase reporter
325 gene. HCVpp values were normalized with luciferase activities measured in cells infected
326 with control VSVpp. Values were adjusted to 100 % infection for cells expressing the wt
327 forms of CLDN6 and OCLN. Results are presented as mean \pm SD of at least three
328 independent experiments. (E) Transduced Huh-7-Lunet-CD81-FLuc cells, which
329 endogenously expressed the *Firefly*-luciferase reporter gene, were infected with HCVcc

330 expressing the *Gaussia*-luciferase reporter gene. At 30h post-infection, cells were lysed and
331 luciferase activities were measured with the Dual-luciferase® reporter assay system
332 (Promega). *Gaussia*-luciferase activities were normalized to Huh-7-Lunet-CD81 cells *Firefly*-
333 luciferase activities. Results were adjusted to 100 % infection for cells expressing the wt
334 forms of CLDN6 and OCLN. Results are presented as mean \pm SD of at least three
335 independent experiments. (F) Two days after the last transduction round, HepG2-CD81-1SC3
336 cells were plated on transwells and polarization was induced. After polarization, cells on the
337 lower chamber of the transwell were infected with HCVcc2a. At 30h after infection, cells
338 were lysed, total RNA was extracted and viral RNA was quantified by qRT-PCR. Results
339 shown are from one experiment representative of three independent experiments. (G)
340 Transduced PHH (Biopredic) were infected with cell culture adapted HCVcc2a (15). Non-
341 transduced PHH (Mock) and PHH transduced with a lentiviral vector expressing only the
342 Yellow Fluorescent Protein (YFP) were used as controls. Virus that had been inactivated at 60
343 °C for 30 min (inactivated HCVcc) was used as another control. Infection levels were
344 evaluated by quantifying HCV RNAs. Two independent experiments on PHH were
345 performed. Results presented in G are the mean \pm SD of triplicates done on PHH from one
346 liver resection.

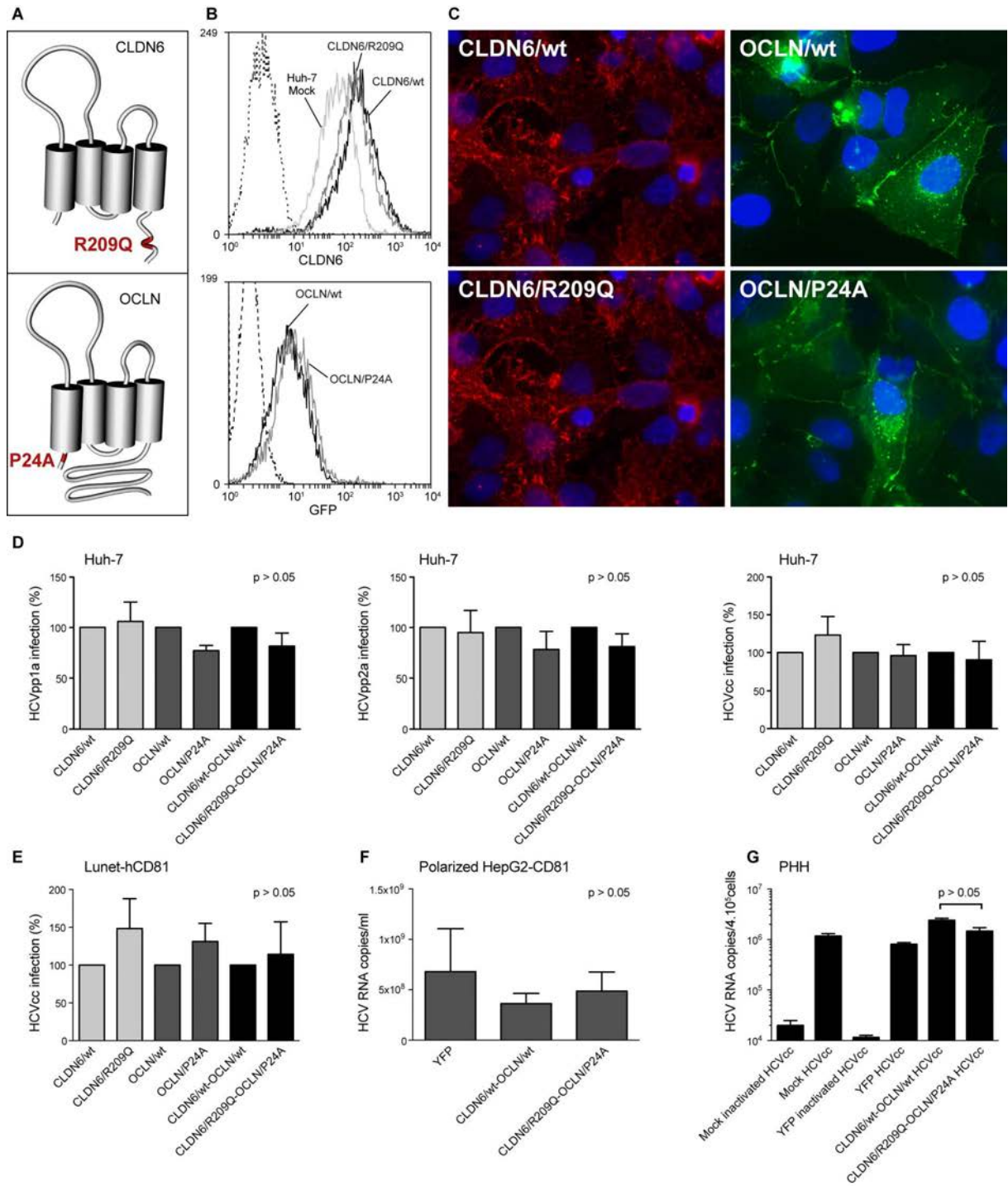


Figure 1

Supplementary information

[Click here to download Manuscript: LF-MS2-JID-SUPMAT-12-08-14.docx](#)

1 **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

2

3 **RESULTS**

4 To characterize the functionality of CLDN6 and OCLN variants in HCV infection, we
5 used HCVpp that are retroviral particles pseudotyped with HCV E1E2 envelope proteins from
6 different genotypes (1a, 2a ...) or control envelope protein (VSV-G) (1). HCVpp enable to
7 study specifically the entry step of HCV lifecycle. We also used HCVcc that are infectious
8 particles produced in cell culture and which allow for the study of the whole lifecycle of HCV
9 (2).

10 Since it has been described that 293T cells become permissive to HCVpp, when
11 expressing CLDN6 or CLDN9 proteins (3,4), we first analyzed the functionality of
12 CLDN6/R209Q in these cells. Lentivectors expressing CLDN6/wt or CLDN6/R209Q were
13 generated and used to transduce 293T cells. Both proteins were equally cell surface
14 expressed, as controlled by flow cytometry (**Supplementary Figure 1A**) and
15 immunofluorescence (**Supplementary Figure 1B**). Next, transduced 293T cells were infected
16 with HCVpp1a and HCVpp2a expressing the *Firefly*-Luciferase reporter gene. However, no
17 luciferase activity was observed in cells expressing either CLDN6/wt or CLDN6/R209Q
18 (**Supplementary Figure 1C**). Since it has been shown that permissiveness of 293T cells can
19 be optimized by overexpression of HCV entry factors (5), we overexpressed either SR-BI,
20 CD81, OCLN or a combination of them in 293T-CLDN6 cells. In contrast to other
21 combinations (**Supplementary Figure 1D**), we managed to increase HCVpp entry when cells
22 were complemented with SR-BI, CD81 and OCLN (**Supplementary Figure 1E**). However,
23 we did not observe any significant effect of the R209Q mutation on the functionality of
24 CLDN6 in HCVpp entry (**Supplementary Figure 1E**).

25 With the same approach as in 293T cells, we used the 786-O cell line, which expresses
26 very low levels of OCLN (6), to study the effect of the P24A mutation on the functionality of
27 OCLN in HCV entry. We transduced 786-O cells with lentivectors expressing OCLN/wt and
28 OCLN/P24A fused to GFP. Both proteins were equally expressed, as controlled by flow
29 cytometry (**Supplementary Figure 1F**) and immunofluorescence (**Supplementary Figure**
30 **1G**). As in 293T cells, 786-O cells expressing OCLN proteins were not permissive to HCVpp
31 infection (**Supplementary Figure 1H**). We therefore optimized cell permissiveness by
32 overexpressing other entry factors. After infection with HCVpp, satisfying infection levels
33 were obtained when cells expressed at least SR-BI in combination with OCLN/wt or
34 OCLN/P24A (**Supplementary Figure 1I** and **1J**). However, for all combinations tested, no
35 significant difference was observed between cells expressing OCLN/wt or OCLN/P24A
36 (**Supplementary Figure 1I** and **1J**). On the whole, our results indicate that the mutation
37 P24A in OCLN has no effect on HCVpp entry in 786-O cells.

38 It has to be noted that the combined ectopic expression of CLDN6/R209Q and
39 OCLN/P24A in TZM cells did not either show an effect of mutations on the functionality of
40 CLDN6 and OCLN in HCV entry (data not shown).

41

42 MATERIAL AND METHODS

43

44 **Patients.** The 2 populations, control (IVDU HIV+HCV+, n=116) and case (IVDU
45 HIV+HCV-, n=22), used in this study have been previously described (7). The Scientific
46 Review Board of Bicêtre Hospital approved the study and all patients gave specific written
47 informed consent.

48

49 **Sequencing of *CLDN6*, *CLDN9*, *OCN* and *SR-BI* genes.** DNA was extracted from
50 peripheral blood mononuclear cells of each individual with a Blood and Cell Culture DNA
51 maxi kit (Qiagen). Pair primers, forward (F) and reverse (R), were designed for each gene to
52 amplify all the exons of *CLDN6* (NM_021195.4), *CLDN9* (NM_020982.3), *OCN*
53 (NM_002538.3) and *SR-BI* (NM_001082959.1) genes. Sequences of primers are available on
54 request. Each exon was amplified with the pair of corresponding F/R primers and classical
55 polymerase chain reaction (PCR) amplification conditions: 5 min at 94°C followed by 30
56 cycles of 30s at 95°C, adjusted hybridization temperature depending on the specific exon
57 amplified (available on request) and a final elongation step of 8 min at 72°C.

58 To avoid amplification of the pseudogene for exons 6 to 9 of the *OCN* gene, a long range
59 (LR) PCR (Qiagen LongRange PCR Kit) was performed as an intermediate step before PCR
60 amplification of the exon. LR PCR amplification conditions were 10 min at 94 °C followed
61 by 30 cycles of 20s at 94°C, 1 min at 68°C and 5 min at 72°C. Then a 10 min final elongation
62 step at 72°C was performed and this amplicon was purified and used as a matrix to amplify
63 exons 6 to 9 of *OCN*, as described above.

64 Sequencing was performed using an ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems,
65 Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Rare variants were
66 confirmed by resequencing independent PCR products.

67 As a predicted splice site was detected in *CLDN6* gene, peripheral white blood cells were
68 collected in a PAXgen Blood RNA collection tube (Qiagen) from the patient and RNA were
69 extracted with a nucleic acid purification kit (PAXgen Blood RNA Kit, Qiagen), then RT-
70 PCR was performed on the corresponding cDNAs using the reverse Transcription kit
71 RETROscript (Ambion). Sequencing of the PCR product was performed by using primers
72 corresponding to the C terminal part of *CLDN6*.

73 The c.70C>G mutation in the *OCN* gene creates a new restriction site for BseX1. This

74 mutation was confirmed by restriction enzyme analysis of a PCR product using this enzyme
75 (Fermentas).

76

77 **Cell culture.** Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), William's medium E, Opti-
78 MEM, phosphate-buffered saline (PBS), Glutamax-I, non-essential amino acids (NEAA),
79 goat and fetal bovine serum (FBS) were from Invitrogen. DMSO and Poly-D-lysine
80 hydrobromide were purchased from Sigma-Aldrich. 4'6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)
81 was purchased from Molecular Probes (Invitrogen). Mowiol 3-88 is from Calbiochem. Huh-7
82 and 293T cells were from ATCC. TZM cells were from the NIH AIDS reagent Program.
83 Huh-7-Lunet-CD81-Fluc-BLR cells (8) were kindly provided by T. Pietschmann (Twincore,
84 Hanover, Germany). 786-O cells were kindly provided by Mariana Varna (Hôpital St Louis,
85 Paris). HepG2-CD81-1SC3 clone was isolated from HepG2 cells expressing CD81 and
86 selected for their capacity to polarize like simple epithelial cells when grown on semi-
87 permeable support (Transwells, Costar) in William's medium E supplemented with 10% FBS
88 and 1% DMSO (S. Bélouzard, unpublished data). The polarization of the cells was confirmed
89 by the localization of apical, basolateral and tight junctions markers and by the secretion of
90 human serum albumin in the basolateral chamber.

91

92 **Antibodies.** The anti-E2 antibody (3-11, kindly provided by J. McKeating, University of
93 Birmingham, United Kingdom) (9) was produced *in vitro* by using a MiniPerm apparatus
94 (Heraeus), as recommended by the manufacturer. The anti-NS5 (2F6/G11) was from Austral
95 Biologicals. The anti-CLDN6 (342927) was from R&D Systems. Secondary antibodies were
96 from Jackson Immunoresearch.

97

98 **Lentivectors cloning and production.** Wildtype (wt) and mutant CLDN6 (R209Q) were
99 cloned into pTRIP vector kindly provided by C. M. Rice (The Rockefeller University, New
100 York, USA). Since there is no antibody directed against the extracellular domains of OCLN,
101 we fused OCLN to GFP, at its C-terminus to avoid any effect of the GFP on the N-terminal
102 mutation. GFP-tagged wt and mutant OCLN (P24A) were also cloned into pTRIP vector.
103 pTRIP-YFP, pTRIP-SR-BI, pTRIP-venus-OCLN, pTRIP-cerulean-CLDN1 and pTRIP-
104 mcherry-CD81 were described previously (6) and kindly provided by C. M. Rice.
105 Lentivectors were produced by transfecting 293T cells with pTRIP constructs, PhCMV-
106 VSVG and HIV gag-pol, with Exgen 500 (Euromedex) according to the manufacturer
107 instructions. Medium was changed 6 h after transfection and cells were incubated at 32°C for
108 72 h. Supernatants containing lentivectors were filtered at 0.45 µm.

109

110 **Transductions.** Supernatants containing lentivectors were added to 293T, 786-O, TZM, Huh-
111 7, Lunet-CD81, or HepG2-CD81-1SC3 cells seeded the day before in 24-well plates to a ratio
112 of 1:4 in serum free DMEM. For infection of PHH, a ratio of 1:2 was used. Cells were
113 incubated for 4 h at 37°C and DMEM 10% FBS was added. Cells were transduced twice at 24
114 h interval. When transductions with multiple lentivectors was required, cells were transduced
115 sequentially twice with each lentivectors and were split (not for PHH) between each
116 transduction with a different lentivector. 293T cells were seeded on poly-D-Lysine coated
117 plates for transductions.

118

119 **HCVpp production and infection.** HCVpp and VSVpp were produced as described
120 previously (1,10) with plasmids kindly provided by B. Bartosch and F.L. Cosset (Lyon,
121 France). Pseudotyped particles were inoculated on 293T, 786-O or Huh-7 cells for 3 h at
122 37°C. At 72 h post-infection, cells were lysed and processed to measure the *Firefly* luciferase

123 activities as indicated by the manufacturer (Promega). Luciferase activities with HCVpp were
124 normalized for luciferase activities obtained with VSVpp. In each figure, results are reported
125 as the mean \pm S.D. of at least three independent experiments.

126

127 **HCVcc and infection assays.** HCVcc used in this study were based on the JFH1 strain (2)
128 and contained cell culture-adaptive mutations (11,12). The intergenotypic GT3a(S52)/JFH1
129 chimera (HCVcc3a) was kindly provided by J. Bukh (University of Copenhagen, Denmark)
130 (13). HCVcc (JFH1/CSN6A4/5'C19Gluc2Aubi) expressing the *Gaussia*-luciferase reporter
131 gene were produced as previously described (11,14).

132 HCVcc were added to cells (m.o.i.=1) seeded the day before in 24-well plates and incubated
133 for 2 h at 37°C. The supernatants were then removed and the cells were incubated in DMEM
134 10% FBS at 37°C. At 30 h post-infection, *Gaussia*-luciferase assays were performed as
135 indicated by the manufacturer (Promega). In each figure, results are reported as the mean \pm
136 S.D. of at least three independent experiments.

137

138 **Indirect immunofluorescence microscopy.** Transduced cells grown on coverslips were
139 fixed with formalin solution (Sigma-Aldrich) or methanol. Cells were then stained with anti-
140 CLDN6 mAb followed by CY3-conjugated goat anti-mouse and DAPI staining. Coverslips
141 were mounted on glass slides using Mowiol, and observed with a Zeiss Axioplan 2 Axiophot
142 2 equipped with a 40 \times /1.3 numerical aperture lens. Fluorescent signals were collected with a
143 Princeton cooled charged device using specific fluorescence excitation and emission filters.
144 Images were processed with Image J software.

145

146 **Flow cytometry.** Cells grown in 24-well plates were directly washed with PBS 2% BSA.
147 Cells were then incubated for 1 h at 4°C with anti-CLDN6 mAb. After rinsing, cells were

148 incubated with PE-labelled goat anti-mouse for 45 min at 4°C, washed, detached with PBS 2
149 mM EDTA and fixed with formalin solution. For OCLN expression, cells were washed,
150 detached with PBS 2 mM EDTA and fixed with formalin solution. Cells were next analyzed
151 with a FACSCalibur (Becton Dickinson).

152

153 **HCVcc cell-to-cell transmission assay.** Twenty-four hours prior to their use in the assay,
154 Huh-7 cells were infected with HCVcc expressing structural proteins from genotype 2a
155 (HCVcc2a) or genotype 3a (HCVcc3a) (m.o.i = 2). Infected cells were then labeled with 5
156 chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) (Molecular Probes, Invitrogen) by incubation
157 for 30 min at 37°C with 10 µM CMFDA in medium without FBS. Cells were trypsinized,
158 washed and incubated for 15 min with 3-11 mAb (50 mg/ml) to neutralize any remaining viral
159 particles at the cell surface. After washing, CMFDA-labeled donor cells were mixed with
160 naïve target cell lines (ratio 1:4), seeded in 24-well plates in the presence (cell-to-cell
161 transmission) or in the absence (cell-free and cell-to-cell transmission) of neutralizing mAb
162 (3-11, 50 µg/ml). After 24 h, *de novo* transmission events were determined by staining for
163 HCV NS5 and were quantified by flow cytometry, as described above. Cell-to-cell
164 transmission levels were defined as newly infected cells in the presence of 3-11 mAb. Cell-
165 free transmission levels were evaluated using the following calculation: (*de novo* infected
166 cells in the absence of 3-11) - (*de novo* infected cells in the presence of 3-11).

167

168 **HepG2-CD81-1SC3 polarization and infection.** HepG2-CD81-1SC3 cells were seeded the
169 day before transduction on 6-well plates coated with gelatin in DMEM 10% FBS. Cells were
170 transduced twice at 24 h interval. 24 h after the last transduction round, cells were plated on
171 transwells in DMEM 10% FBS until confluence was reached. Next, medium was replaced by
172 William's Medium E 1% DMSO. Polarization was verified by anti-ZO-1 mAb staining,

173 analyzed by indirect immunofluorescence microscopy (data not shown). Cells were infected
174 with HCVcc2a by 1 h incubation of the virus on basolateral chamber membrane of the
175 transwell. Supernatants and cell lysates were collected 30 h after infection and RNA were
176 extracted with NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer
177 instructions. HCV RNA was quantified by quantitative real-time RT-PCR assay as described
178 previously (15).

179

180 **Primary human hepatocytes infection assays.**

181 Primary human hepatocytes (PHH) were from Biopredic. They were infected with cell culture
182 adapted HCVcc (JFH1-i24), as previously described (16). Virus that had been inactivated at
183 60 °C for 30 min was used as a control. Infection levels were evaluated by quantifying HCV
184 RNAs, as described in (16).

185

186 **FIGURE LEGENDS**

187

188 **Supplementary Figure 1: CLDN6/R209Q and OCLN/P24A mutations do not affect**
189 **HCVpp entry.**

190 (A) 293T cells were transduced twice at 24h interval with CLDN6/wt or CLDN6/R209Q.
191 Two days after the last transduction round, CLDN6/wt and CLDN6/R209Q cell surface
192 expression was measured by flow cytometry using an anti-CLDN6 mAb, and compared to
193 that of untransduced 293T cells (293T Mock). Cells stained with secondary antibodies were
194 used as negative controls (dashed line). (B) CLDN6/wt and CLDN6/R209Q expression in
195 293T cells was also analyzed by indirect immunofluorescence with an anti-CLDN6 mAb. (C)
196 Two days after the last transduction, 293T cells were infected with HCVpp1a, HCVpp2a or
197 VSVpp expressing the *Firefly*-luciferase reporter gene. Results are presented in relative
198 luciferase units (RLU). (D) 293T cells were transduced sequentially with a combination of
199 lentivectors encoding SR-BI, CD81 or OCLN in addition to CLDN6/wt or CLDN6/R209Q.
200 Cells were next infected with HCVpp1a or VSVpp 48h after the last transduction round. (E)
201 293T cells transduced to express SR-BI, CD81 and OCLN in addition to CLDN6/wt or
202 CLDN6/R209Q were infected with HCVpp1a or VSVpp. (F) 786-O cells were transduced
203 twice at 24h interval with OCLN/wt or OCLN/P24A. Two days after the last transduction
204 round, OCLN/wt and OCLN/P24A expression in 786-O cells was estimated through the
205 percentage of GFP positive cells by flow cytometry analysis. (G) GFP-tagged OCLN/wt and
206 OCLN/P24A cell surface expression in 786-O cells was controlled by fluorescent
207 microscopy. (H) 786-O cells expressing OCLN/wt or OCLN/P24A were infected with
208 HCVpp1a, HCVpp2a or VSVpp. Results are presented in relative luciferase units (RLU). (I)
209 786-O cells were transduced sequentially with a combination of lentivectors encoding SR-BI,
210 CD81 or CLDN1 in addition to OCLN/wt or OCLN/P24A. Cells were next infected with

211 HCVpp 1a or VSVpp. **(J)** 786-O cells transduced to express SR-BI, CD81 and CLDN1 in
212 addition to OCLN/wt or OCLN/P24A were infected with HCVpp1a or VSVpp. In D, E, I and
213 J cells were lysed at 72h post-infection and results were normalized with luciferase activities
214 measured in cells infected with VSVpp. Values were adjusted to 100 % infection for cells
215 expressing CLDN6/wt (D and E) or OCLN/wt (I and J). Results are presented as mean \pm SD
216 of three independent experiments. *** means a *p* value below 0.001.

217

218 **Supplementary Figure 2: CLDN6/R209Q and OCLN/P24A mutations do not affect the**
219 **kinetic of HCV entry and HCV cell-to-cell transmission.** Huh-7 cells were transduced
220 with CLDN6/wt or CLDN6/R209Q and OCLN/wt or OCLN/P24A either alone or in
221 combination. **(A)** Forty-eight hours after the last transduction round, cells were infected with
222 HCVcc for 2h, 1h30, 1h or 30min. After infection, cells were rinsed and fresh medium was
223 added. At 30h post-infection, cells were lysed and *Gaussia*-luciferase activities were
224 measured. Results were normalized to luciferase activities measured in cells expressing the wt
225 forms of CLDN6 and OCLN. **(B)** Cells were infected with HCVcc at indicated m.o.i. in
226 serum-free DMEM for 2 h. At 30 h post-infection, cells were lysed and *Gaussia*-luciferase
227 activities were measured. Results were normalized to luciferase activities measured in cells
228 expressing the wt forms of CLDN6 and OCLN. Results are presented as mean \pm SD of two
229 independent experiments. **(C)** Transduced Huh-7 cells were cocultivated for 24h with
230 CMFDA-stained donor cells infected with HCVcc2a or HCVcc3a **(D)** in the presence (cell-to-
231 cell transmission) or in the absence (cell-free and cell-to-cell transmission) of the 3-11
232 neutralizing antibody, which prevents the cell-free transmission. Cells were stained with an
233 anti-NS5 antibody and analyzed by flow cytometry. HCV-positive CMFDA-negative cell
234 populations were considered as newly infected cells through cell-to-cell transmission. Results

235 of cell-free (light grey) and cell-to-cell (black) transmission are presented as percentages
236 relative to the total transmission.
237

238 **Supplementary Table 1 : Variants found in *CLDN6*, *CLDN9*, *OCN* and *SR-BI* genes**

239

dbSNP ^a in <i>CLDN6</i> gene NM_021195.4	c.42 A>G	c.99 C>T	c.258 C>T	c.267 T>C	c.388 G>C	c.408 G>A	c.427 A>G	c.477 G>T	c.626 G>A			
Exon	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
Amino acid position	p.Thr14 syn ^b	p.Thr33 syn	p.Ile86 syn	p.Leu89 syn	p.Val130Leu mis ^c	p.Val136 syn	p.Ile143Val mis	p.Glu159Asp mis	p.Arg209Gln mis			
Database	1000 Gen ^d rs9640735	1000 Gen rs2269911	1000 Gen rs56575146	1000 Gen rs1747769	1000 Gen rs138377300	1000 Gen rs147689167	1000 Gen rs2237295	NCBI NA ^e	NCBI rs1448635777			
MAF ^f	0.024	0.225	0.028	0.03	0.006	0.008	0.319	NA	NA			
IVDU HIV+HCV+ N= 116	A>G n= 4	C>T n= 30	C>T n= 7	T>C n= 7	G>C n= 1	G>A n= 3	A>G n= 60	G>T n= 1	0			
IVDU HIV+HCV- N= 22	0	C>T n= 8	C>T n= 2	T>C n= 1	0	0	A>G n= 13	0	G>A n= 1			
dbSNP in <i>CLDN9</i> gene NM_020982.3	c.60 G>C	c.552 G>A										
Exon	1	1										
Amino acid position	p.Gly20 syn	p.Thr184 syn										
Database	1000 Gen rs114794799	1000 Gen rs200866551										
MAF	0.01	0.002										
IVDU HIV+HCV+ N= 116	G>C n= 2	G>A n= 1										
IVDU HIV+HCV- N= 22	0	0										
dbSNP in <i>OCN</i> gene NM_002538.3	c.70 C>G	c.699 G>A	c.922 G>A	c.938 C>A	c.1512 G>C							
Exon	3	3	5	5	9							
Amino acid position	p.Pro24Ala mis	p.Leu233 syn	p.Val308Met mis	p.Ser313Tyr mis	p.Lys504Asn mis							
Database	1000 Gen rs147125035	1000 Gen rs35107257	NCBI rs369518478	NCBI NA	NCBI rs2666626							
MAF	0.036	0.021	NA	NA	NA							
IVDU HIV+HCV+ N= 116	0	G>A n= 4	G>A n= 3	C>A n= 1	G>C n= 18							
IVDU HIV+HCV- N= 22	C>G n= 1	0	0	0	G>C n= 2							
dbSNP in <i>SR-BI</i> gene NM_001082959.1	1NC-29 C>T	c.4 G>A	c.12 C>T	c.63 C>T	c.94 G>A	c.403 G>A	NC+23 C>T	c.903 C>T	c.1050 T>C	c.1056 G>A	c.1129-7 G>A	c.1158 G>A
Exon	1	1	1	1	1	3	3	7	8	8	9	9
Amino acid position	NC ^g	p.Gly25Ser mis	p.Ser4 syn	p.Cys21 syn	p.Val32Met mis	p.Val135Ile mis	NC	p.Phe301 syn	p.Ala350 syn	p.Pro352 syn	NC	p.Val386 syn
Database	NCBI NA	1000 Gen rs4238001	1000 Gen rs2070242	1000 Gen rs10396208	1000 Gen rs10396208	1000 Gen rs5891	NCBI NA	1000 Gen rs5892	1000 Gen rs5588	1000 Gen rs372663606	1000 Gen rs10396210	1000 Gen rs9829257
MAF	NA	0.075	0.028	0.013	0.013	0.007	NA	0.033	0.331	NA	0.0289	0.0095
IVDU HIV+HCV+ N= 116	C>T n= 1	G>A n= 4	C>T n= 1	C>T n= 2	G>A n= 1	0	0	C>T n= 1	T>C n= 19	0	G>A n= 1	G>A n= 1
IVDU HIV+HCV- N= 22	0	0	0	0	0	G>A n= 1	C>T n= 1	C>T n= 1	T>C n= 5	G>A n= 1	0	0

240

241 ^a Database single nucleotide polymorphism

242 ^b Synonymous

243 ^c Missense

244 ^d 1000 Genomes

245 ^e refSNP

246 ^f Non attributed

247 ^g Minor allele frequency

248 ^h Non coding

249

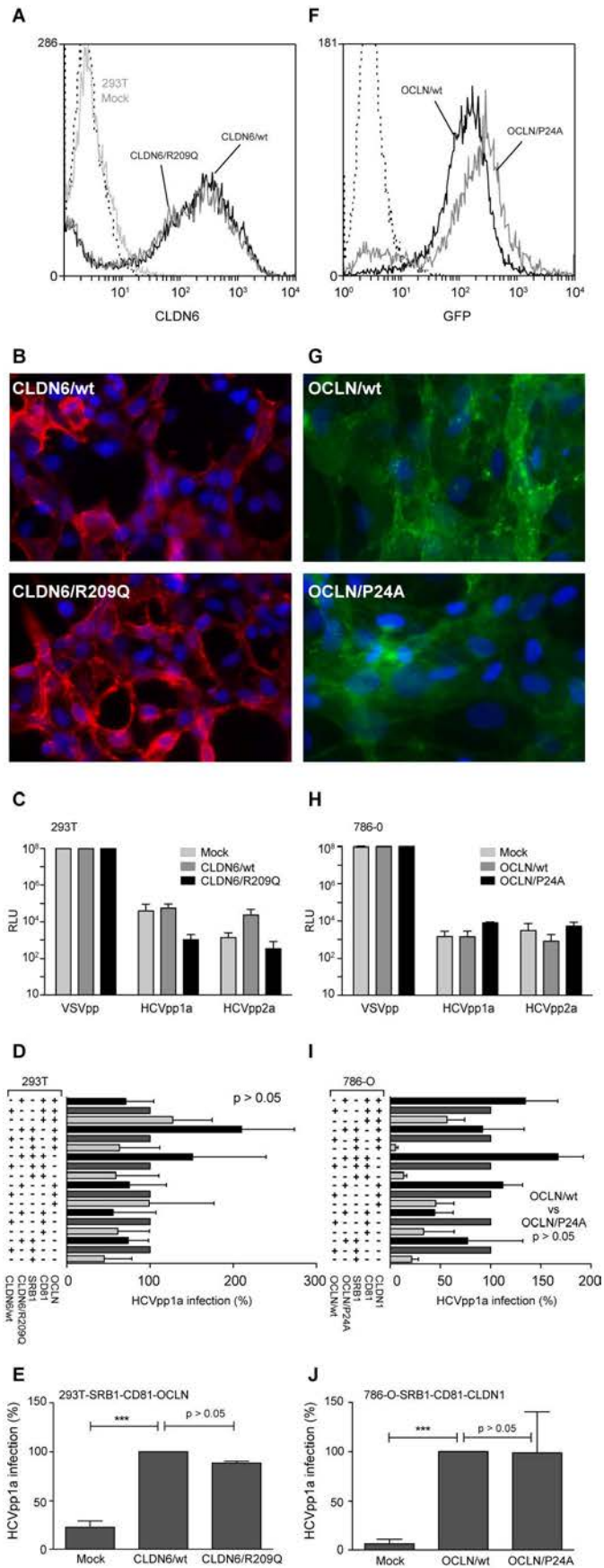
250

251

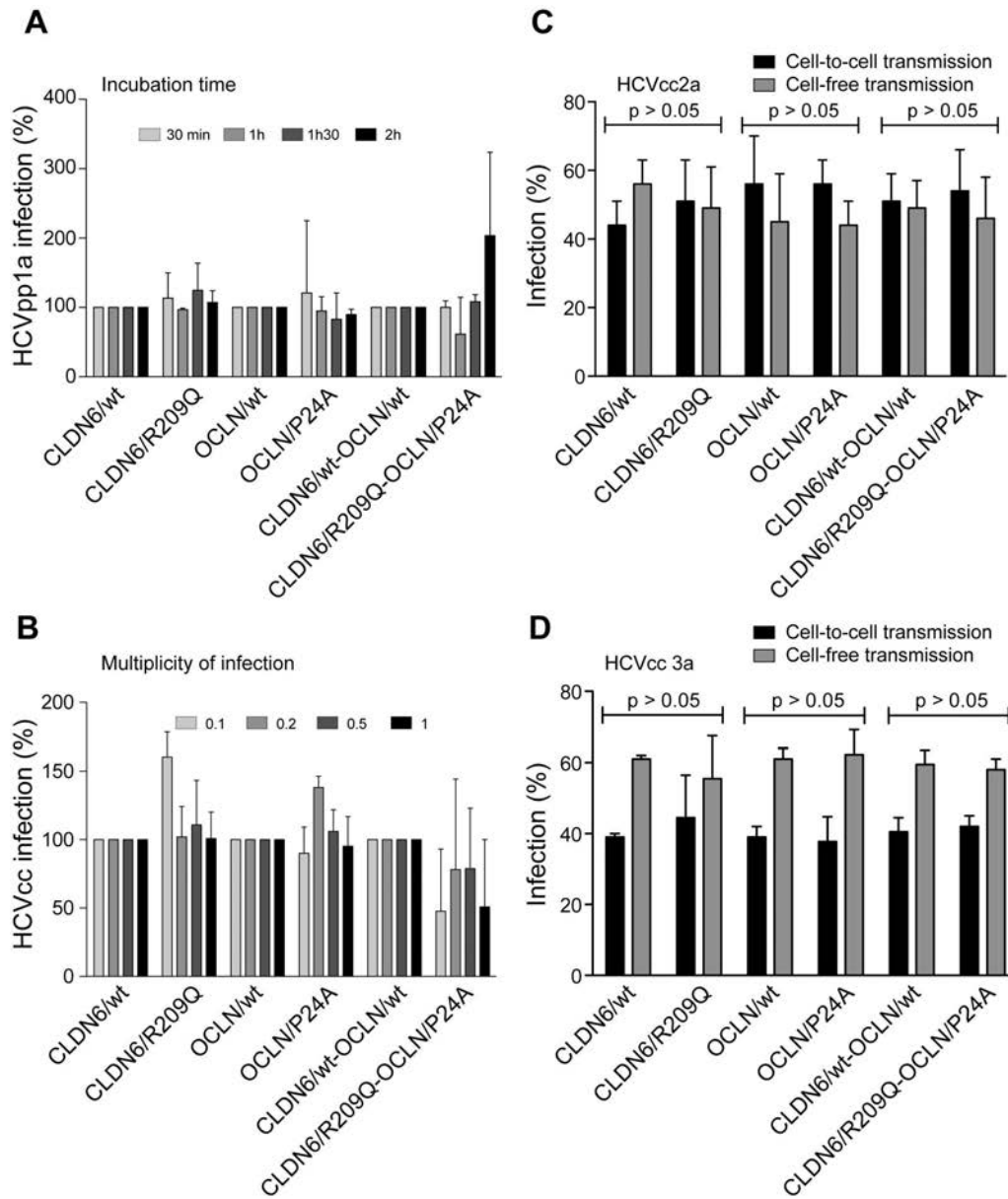
252 REFERENCES

- 253 1. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset F-L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles
254 containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med.* **2003**;
255 197(5):633–642.
- 256 2. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of
257 infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.*
258 **2005**; 11(7):791–796.
- 259 3. Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, et al. Claudin-6 and claudin-9 function as
260 additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol.* **2007**; 81(22):12465–12471.
- 261 4. Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset F-L, et al. The
262 tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C
263 virus. *J Virol.* **2008**; 82(7):3555–3560.
- 264 5. Da Costa D, Turek M, Felmler DJ, Girardi E, Pfeffer S, Long G, et al. Reconstitution
265 of the Entire Hepatitis C Virus Life Cycle in Nonhepatic Cells. *J Virol.* **2012**;
266 86(21):11919–11925.
- 267 6. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, De Jong YP, et al. Human
268 occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells.
269 *Nature.* **2009**; 457(7231):882–886.
- 270 7. Ghosn J, Alibeu O, Sahali S, Quertainmont Y, Meyer L, Salmon D, et al. Claudin-1
271 gene variants and susceptibility to Hepatitis C infection in HIV-1 infected
272 intravenous drug users (an ANRS case-control study). *Journal of Hepatology.*
273 **2012**; 56:S347.
- 274 8. Gentzsch J, Hinkelmann B, Kaderali L, Irschik H, Jansen R, Sasse F, et al. Hepatitis C
275 virus complete life cycle screen for identification of small molecules with pro- or
276 antiviral activity. *Antiviral Research.* **2011**; 89(2):136–148.
- 277 9. Cocquerel L, Meunier JC, Pillez A, Wychowski C, Dubuisson J. A retention signal
278 necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the
279 transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol.* **1998**;
280 72(3):2183–2191.
- 281 10. Op De Beeck A, Voisset C, Bartosch B, Ciczora Y, Cocquerel L, Keck Z, et al.
282 Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol.*
283 **2004**; 78(6):2994–3002.
- 284 11. Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouille Y, Dubuisson J, et al. Robust
285 production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in
286 hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol.* **2007**; 88(Pt 9):2495–2503.
- 287 12. Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, Roingeard P, Descamps V, Duverlie G, et al.
288 Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA
289 replication. *J Virol.* **2010**; 84(2):773–787.

- 290 13. Gottwein JM, Scheel TKH, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML, et al.
291 Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture
292 systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral
293 drugs. *Hepatology*. **2009**; 49(2):364–377.
- 294 14. Rocha-Perugini V, Montpellier C, Delgrange D, Wychowski C, Helle F, Pillez A, et al.
295 The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE*. **2008**;
296 3(4):e1866.
- 297 15. Castelain S, Descamps V, Thibault V, François C, Bonte D, Morel V, et al. TaqMan
298 amplification system with an internal positive control for HCV RNA quantitation. *J*
299 *Clin Virol*. **2004**; 31(3):227–234.
- 300 16. Helle F, Brochot E, Fournier C, Descamps V, Izquierdo L, Hoffmann TW, et al.
301 Permissivity of primary human hepatocytes and different hepatoma cell lines to
302 cell culture adapted hepatitis C virus. *PLoS ONE*. **2013**; 8(8):e70809.
- 303



Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2

Partie 2 :

*CD151, un organisateur moléculaire
potentiel de l' entrée du HCV*

Partie 2 :

CD151, un organisateur moléculaire potentiel de l'entrée du HCV.

Neutralisation de l'infection par des anticorps anti-tétraspanines

Afin de caractériser l'effet potentiel des tétraspanines CD82, CD151, CD63, et Tspan8, nous avons tout d'abord réalisé des expériences de neutralisation par des anticorps spécifiques de ces tétraspanines. Comme contrôle positif de neutralisation, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre CD81 et comme contrôle négatif de neutralisation, nous avons utilisé des anticorps irrelevants. Nous avons préincubé les cellules 1h à 4°C dans du milieu sans sérum en présence des anticorps à des concentrations de 5 et 30 µg/ml. Les cellules ont été infectées par des HCVcc exprimant la *Gaussia*-luciférase et incubées 2h en présence des anticorps neutralisants. Parallèlement, nous avons choisi d'utiliser en contrôle des pseudovirions du HPV de type 16 (PsV HPV16) contenant un plasmide codant la *Firefly*-luciférase. En effet, il a été montré que le HPV16 utilise les TEMs pour entrer dans ses cellules cibles. En particulier, les tétraspanines CD151 et CD63 sont importantes pour l'entrée de HPV. Ces infections ont été réalisées dans les mêmes conditions que les infections par les HCVcc, mais sur des cellules 293TT. Ces expériences ont montré qu'à des concentrations de 30 µg/ml, les anticorps dirigés contre CD63 et CD151 inhibaient l'infection par le HCV (**Figure 1A**), alors que ceux-ci à des concentrations de 5 µg/ml étaient sans effet. La même observation a été faite pour les infections HPV16 avec CD151 mais pas avec CD63 (**Figure 1B**). Un anticorps dirigé contre l'intégrine β1, un partenaire privilégié de CD151, a également été utilisé mais n'a pas montré d'effet sur l'infection par le HCV (**Figure 1A**).

Ces premiers résultats indiquent que les tétraspanines CD63 et CD151 pourraient être impliquées dans l'infection par le HCV, mais auraient plutôt un rôle secondaire par rapport à CD81, pour laquelle l'effet inhibiteur des anticorps neutralisants était fortement marqué à 5 µg/ml (**Figure 1A**).

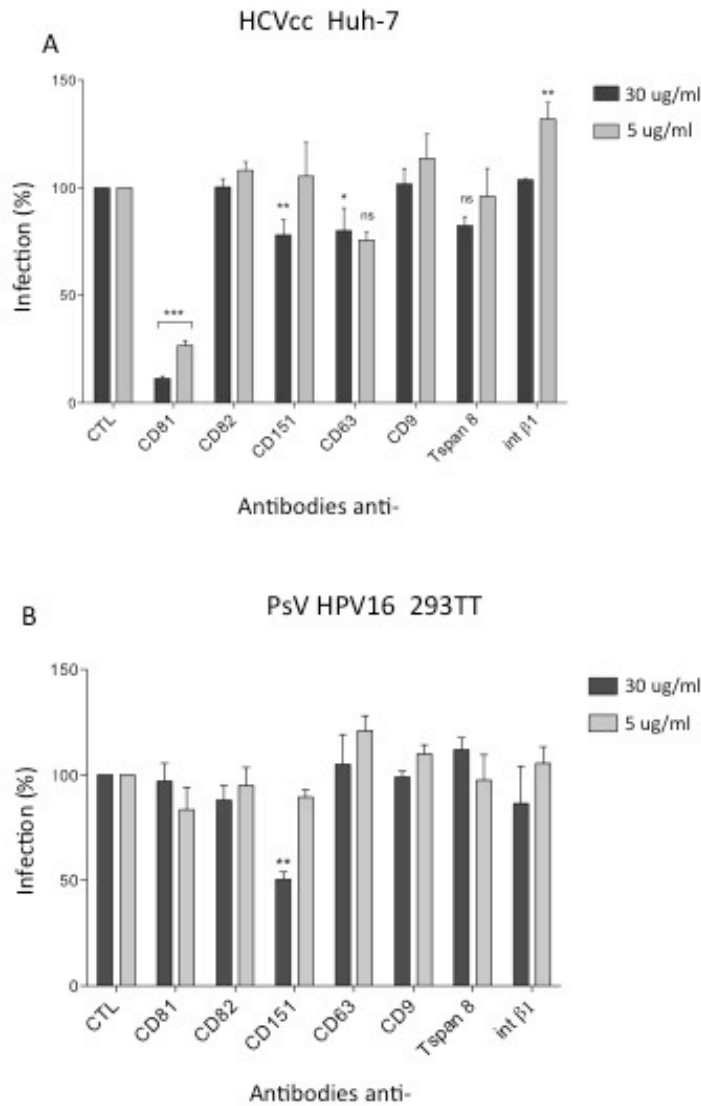


Figure 1 : Effet d’anticorps anti-tétraspansines sur l’infection par le HCV.

A) Les cellules Huh-7 ont été préincubées pendant 1h à 4°C avec des anticorps dirigés contre les différentes tétraspansines ou l’intégrine β1. Des IgG de souris non relevants ont été utilisés comme contrôle négatif. Les cellules ont ensuite été infectées pendant 2h à 37°C avec des HCVcc couplés à la *Gaussia*-Luciférase dans du milieu sans sérum, puis les cellules ont été rincées et du milieu complet a été ajouté. Les cellules ont été lysées 48h après infection et les activités luciférase ont été évaluées par luminométrie. Les résultats ont été normalisés par rapport aux activités luciférase mesurées avec l’anticorps contrôle. **B)** Les cellules 293TT ont été traitées de la même manière que les cellules Huh-7, puis elles ont été infectées pendant 2h à 37°C par des PsV HPV16 exprimant la *Firefly*-luciférase. Les cellules ont été lysées 24h après infection et les activités luciférase ont été évaluées par luminométrie. Les résultats montrés sont la moyenne d’au moins trois expériences indépendantes. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001.

Le silencing de CD151 inhibe l’infection par le HCV

Afin de valider les résultats obtenus avec les anticorps, nous avons ensuite réalisé le silencing des différentes tétraspansines à l’aide de siRNAs. Des expériences

préliminaires de silencing ont montré qu'un niveau optimal de silencing dans les cellules Huh-7 était obtenu 48h après deux transfections de siRNAs. Cependant, le silencing de CD82 et CD9 était faible, du à leur faible niveau d'expression dans les cellules Huh-7 (**Figure 2A**). En revanche, en cellules 293TT, les niveaux de silencing dans les mêmes conditions étaient plus faibles (données non montrées).

Afin de vérifier que la transfection par les différents siRNAs utilisés n'induisait pas de toxicité cellulaire, nous avons réalisé un test MTS 96h après la deuxième transfection sur des cellules Huh-7. Aucune toxicité particulière n'a été observée (**Figure 2B**).

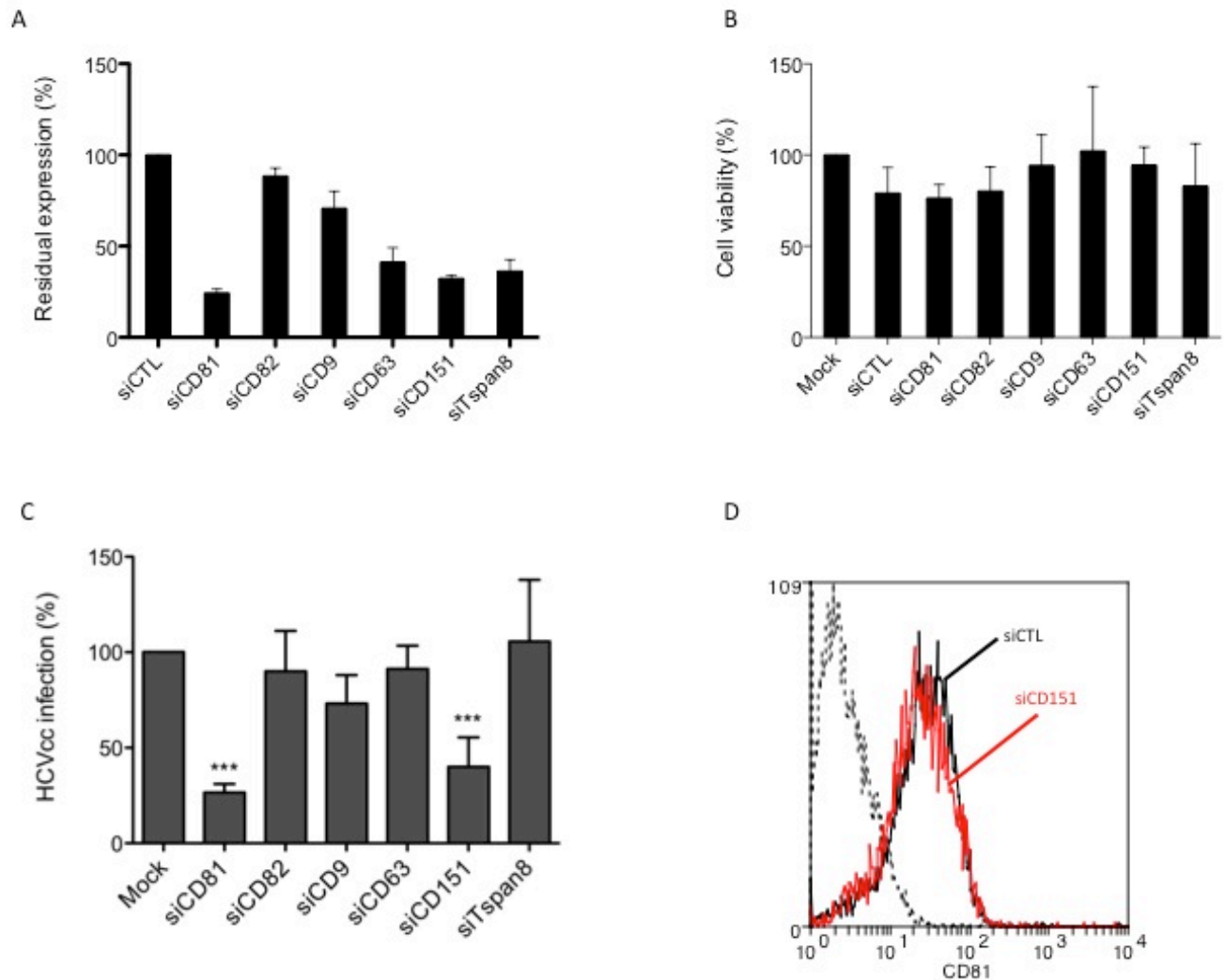


Figure 2 : Effet du silencing des tétraspanines sur l’infection par le HCV.

A) Les cellules Huh-7 ont été transfectées deux fois à 48h d’intervalle par les siRNAs dirigés contre les différentes tétraspanines. Un siRNA non relevant dans ces cellules a été utilisé comme contrôle. Deux jours après la deuxième transfection, les niveaux d’expression des tétraspanines dans les différentes conditions ont été mesurés par cytométrie en flux. Le pourcentage d’expression résiduelle des différentes tétraspanines dans les cellules silencées a été mesuré en calculant le ratio des médianes d’intensité de fluorescence des cellules silencées par rapport aux cellules traitées avec un siRNA contrôle. Les résultats montrés sont la moyenne d’au moins trois expériences indépendantes. **B)** Les cellules Huh-7 ont été transfectées deux fois comme décrit précédemment et 96h après transfection, la toxicité cellulaire des différents siRNAs a été évaluée à l’aide d’un test MTS/PMS. Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes. **C)** Les cellules ont été transfectées deux fois avec les siRNAs, comme décrit précédemment, puis 48h après la deuxième transfection, les cellules ont été infectées pendant 2h à 37°C avec des HCVcc exprimant la *Gaussia*-Luciférase. Trente heures après infection, les activités luciférase ont été évaluées par luminométrie. Les résultats montrés sont la moyenne d’au moins trois expériences indépendantes. *** p < 0,001. **D)** Les cellules Huh-7 transfectées avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre CD151 ont été marquées avec un anticorps anti-CD81 (5A6) et analysées en cytométrie en flux.

Les cellules Huh-7 et 293TT ont alors été infectées 48h après la deuxième transfection avec des HCVcc et des pseudovirus HPV16, respectivement. Les niveaux

d'infection ont été évalués respectivement, 48 et 24h après l'infection. Un siRNA dirigé contre CD81 a été utilisé comme contrôle positif d'inhibition pour le HCV. De manière intéressante, nous avons observé une inhibition de 60 % de l'infection par le HCV dans les cellules n'exprimant plus CD151, confirmant les résultats obtenus en neutralisation. En revanche, ces expériences n'ont pas confirmé l'effet de CD63 obtenu en neutralisation (**Figure 2C**). Par ailleurs, les expériences de silencing menées sur des 293TT avec les pseudovirions de HPV16 n'ont montré aucune inhibition de l'infection, ce qui pourrait être dû aux faibles niveaux de silencing dans ces cellules (données non montrées). Nous avons par la suite, abandonné ce modèle.

Dans le but de vérifier que l'effet inhibiteur du silencing de CD151 était bien spécifique, nous avons testé si les siRNAs dirigés contre CD151 n'avaient pas d'effet sur l'expression de CD81. Aucune diminution de l'expression de CD81 n'a été observée 48h après la transfection des siRNAs dirigés contre CD151 (**Figure 2D**). Ceci suggère donc que l'effet observé est bien spécifique.

L'ensemble de ces résultats montre donc que la tétraspanine CD151 pourrait avoir un rôle dans le cycle infectieux du HCV.

La surexpression des tétraspanines n'affecte pas l'infection par le HCV

Nous avons ensuite analysé l'effet de la surexpression des tétraspanines sur l'infection HCV. Pour cela, nous avons généré des vecteurs lentiviraux exprimant les tétraspanines CD81, CD82, CD9, CD63, CD151, et Tspan8, fusionnées à la GFP. Ces lentivecteurs permettent de surexprimer efficacement les différentes tétraspanines dans des cellules Huh-7, puisque deux transductions successives permettent d'atteindre des taux de 80-90% de cellules exprimant la GFP (données non montrées). Les niveaux de surexpression évalués en cytométrie en flux ont montré par exemple une augmentation de 6 fois pour CD63 à près de 60 fois pour CD9 (**Figure 3A**). En revanche, la toxicité induite par la surexpression de CD81 n'a pas permis d'augmenter significativement l'expression de cette tétraspanine dans notre système (**Figure 3A**). Les cellules transduites ont ensuite été infectées par des HCVcc et l'analyse du pourcentage de cellules infectées n'a montré aucun effet de la surexpression des différentes tétraspanines sur l'infection par le HCV. Il n'est pas à exclure, comme cela a été montré pour CD81, qu'un effet seuil empêche de voir une augmentation de l'infection dans le cas

de facteurs facilitateurs de l'infection.

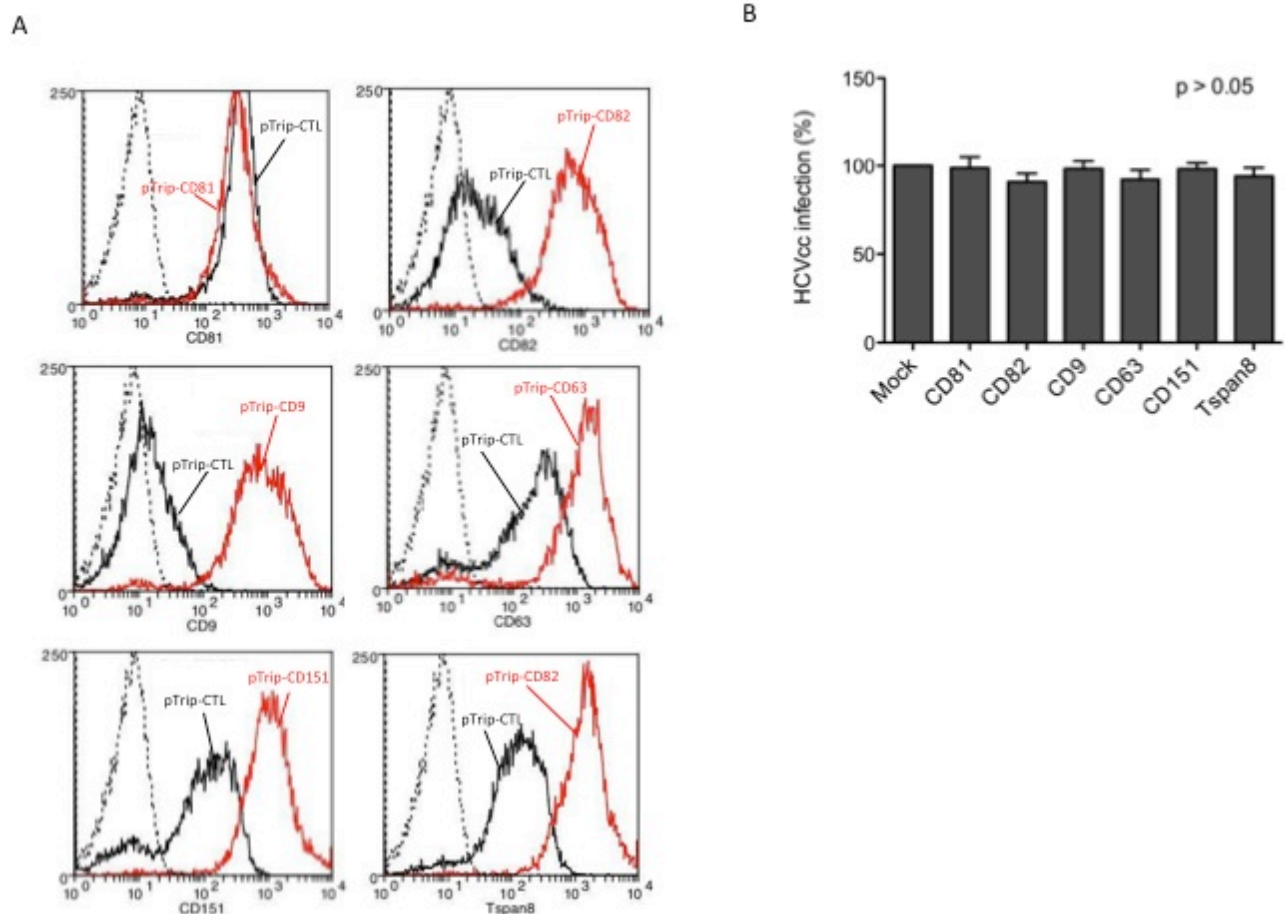


Figure 3 : Effet de la surexpression des tétraspanines sur l'infection par le HCV.

A) Des lentivecteurs pTrip exprimant les différentes tétraspanines fusionnées à la GFP ont été générés. Les cellules Huh-7 ont été transduites deux fois à 24h d'intervalle par les différents lentivecteurs ou un lentivecteur contrôle exprimant uniquement la YFP (pTRIP-CTL). Deux jours après la deuxième transduction, les cellules ont été marquées par des anticorps anti-tétraspanines et les marquages ont été analysés par cytométrie en flux. **B)** Les cellules Huh-7 ont été transduites comme décrit précédemment puis 48h après la deuxième transduction, les cellules ont été incubées pendant 2h à 37°C avec des HCVcc. Les niveaux d'infection ont été mesurés 30h après infection par cytométrie en flux en utilisant un anticorps reconnaissant la protéine virale NS5. Le pourcentage d'infection a été mesuré en calculant le ratio des médianes d'intensité de fluorescence des cellules surexprimant les différentes tétraspanines par rapport aux cellules transduites par le lentivecteur contrôle. Les résultats montrés sont la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.

CD151 joue probablement un rôle indirect dans l'entrée virale

Nous avons émis l'hypothèse que CD151 pourrait être impliquée dans l'étape d'entrée du HCV dans ses cellules cibles. Cette implication de CD151 pourrait se faire soit de manière directe, par exemple en interagissant avec les particules, soit de manière indirecte en influençant par exemple la fonctionnalité de CD81 dans l'entrée virale via

les TEMs. Afin de tester la première hypothèse, nous avons testé l'effet de la préincubation de particules virales pendant 1h à 37°C avec des formes solubles (LELs) de CD151, CD81 et d'autres tétraspanines (fournies par le Dr. P. Monk, Sheffield, UK) avant l'infection de cellules Huh-7. Trente heures après infection, les niveaux d'infection ont été évalués. Ces expériences ont montré que seule la préincubation avec la LEL de CD81 conduisait à une inhibition de l'infection (**Figure 4**). Bien qu'on ne puisse pas exclure que la forme soluble de CD151 ne mime pas complètement la forme entière de la protéine, ces résultats suggèrent que les particules virales n'interagissent probablement pas avec CD151.

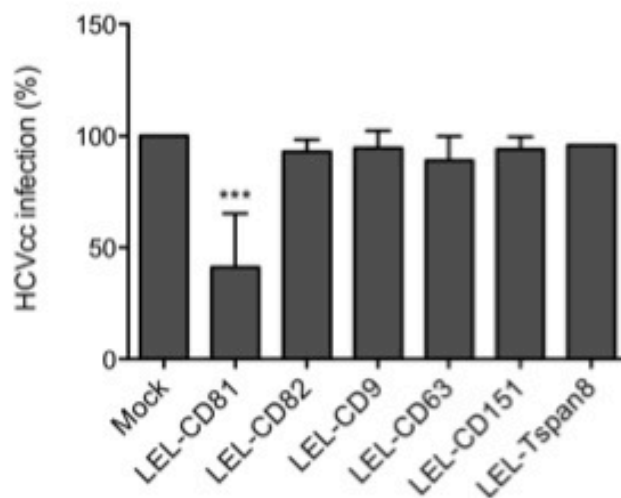


Figure 4 : Effet de la LEL soluble des tétraspanines sur l'infection par le HCV.

Les HCVcc ont été préincubés pendant 1h à 37°C avec 10 µg/ml de LELs solubles des différentes tétraspanines. Des HCVcc non traités ont été utilisés en contrôle. Des cellules Huh-7 ont ensuite été incubées pendant 2h à 37°C avec les HCVcc/LELs. Les niveaux d'infection ont été mesurés 30h après infection par cytométrie en flux en utilisant un anticorps reconnaissant la protéine virale NS5A. Le pourcentage d'infection a été mesuré en calculant le ratio des médianes d'intensité de fluorescence des cellules infectées après préincubation avec les LELs par rapport aux cellules contrôles. Les résultats montrés sont la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes. *** p < 0,001.

CD151 module la clusterisation de CD81

Nous disposons au laboratoire d'une lignée permissive de cellules Huh-7 n'exprimant plus le CD81 humain mais exprimant le CD81 murin (Huh-7w7/mCD81). Nous disposons également de deux anticorps anti-mCD81, le MT81 qui reconnaît l'ensemble des molécules de mCD81 et le MT81w qui reconnaît spécifiquement les clusters de mCD81 (Potel *et al.*, 2013). L'utilisation de ces outils a permis de montrer qu'une clusterisation accrue de CD81 à la surface cellulaire restreint considérablement

la diffusion des molécules de CD81 qui est essentielle à l'entrée virale (Potel *et al.*, 2013)). Afin de tester l'hypothèse du rôle indirect de CD151 sur l'entrée virale, nous avons réalisé des surexpressions ou silencing de CD151 dans les cellules Huh-7w7/mCD81 et réalisé des marquages avec les anticorps MT81 et MT81 \underline{w} .

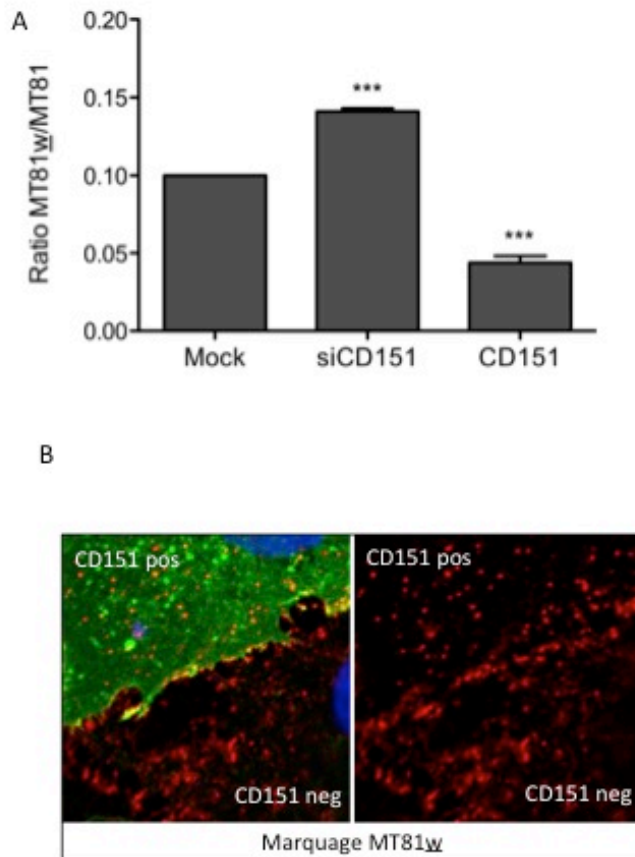


Figure 5 : Effet de CD151 sur la clusterisation de CD81.

A) Les cellules Huh-7w7/mCD81 ont été soit transfectées avec un siCTL ou un siCD151, ou soit transduites par des lentivecteurs exprimant CD151 ou la YFP, comme décrit précédemment. Deux jours après la deuxième transfection ou la deuxième transduction, les cellules ont été marquées soit par l'anticorps MT81 reconnaissant la population totale de mCD81, soit par l'anticorps MT81 \underline{w} reconnaissant mCD81 incorporée dans des clusters riches en CD81. Le ratio des médianes d'intensité de fluorescence des cellules marquées par le MT81 \underline{w} sur les cellules marquées par le MT81 dans chacune des conditions a été mesuré par cytométrie en flux. Les résultats montrés sont la moyenne de trois expériences indépendantes. *** $p < 0,001$. **B)** Des cellules Huh-7 transduites par le lentivecteur exprimant CD151-GFP et marquées avec l'anticorps MT81 \underline{w} suivi d'anticorps anti-rat couplés à l'Alexa555 ont été analysées par microscopie confocale. La superposition des marquages GFP et MT81 \underline{w} est montrée à gauche. Le marquage MT81 \underline{w} est montré à droite. Les cellules GFP positives surexpriment CD151 alors que les cellules GFP négatives expriment des niveaux endogènes de CD151.

Ainsi, comme précédemment, nous avons transfecté deux fois les cellules Huh-7 avec des siRNAs dirigé contre CD151 ou un siRNA contrôle. Deux jours après

transfection, nous avons marqué les cellules avec les anticorps MT81 et MT81 \underline{w} et analysé les marquages par cytométrie en flux. Les ratios des médianes d'intensité de fluorescence obtenus pour chaque anticorps a ensuite été calculé. Nous avons ainsi observé que le silencing de CD151 entraînait une augmentation du ratio MT81 \underline{w} /MT81, ce qui suggère donc qu'en absence de CD151, CD81 est plus présent sous forme de clusters (**Figure 5A**). A l'inverse, la surexpression de CD151 conduit à une diminution du ratio MT81 \underline{w} /MT81, indiquant qu'en présence de CD151, CD81 forme moins de clusters à la membrane plasmique (**Figure 5A**).

De manière surprenante, des analyses préliminaires en microscopie confocale de cellules Huh-7w7/mCD81 surexprimant CD151-GFP et marquées par les anticorps MT81 et MT81 \underline{w} permettent de voir à l'œil l'effet de CD151 sur la taille des domaines enrichis en CD81. En effet, des analyses quantitatives préliminaires montrent que les structures enrichies en CD81 sont trois fois plus grandes dans les cellules ne surexprimant pas CD151 que dans les cellules surexprimant CD151-GFP (**Figure 5B** et données non montrées).

Puisque nous avons démontré précédemment que la clusterisation de CD81 module négativement l'entrée du HCV, nos résultats préliminaires sur CD151 indiquent que CD151 est probablement un modulateur de l'entrée virale jouant sur la clusterisation de CD81, élément clé de cette étape du cycle infectieux.

Matériel et méthodes

Lignées cellulaires. Les cellules Huh-7 (Nakabayashi *et al.*, 1982), 293TT (L. Florin, Mainz, Allemagne), 293T (ATCC) et Huh-7w7/mCD81 (Rocha-Perugini *et al.*, 2009), ont été cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) complémenté par 10% de sérum de veau foetal (SVF) et 100 nM d'acides aminés non essentiels.

Anticorps. L'anticorps anti-CD81 5A6 provient de S. Levy (Université de Stanford, Etats-Unis). L'anticorps anti-Tspan8 TS29.1 provient de C. Boucheix (Villejuif, France). Les anticorps anti-CD63 TS63, anti-CD9 SYB-1, anti-CD151 (TS151 et 11G5a) et anti-mCD81 (MT81 et MT81w) proviennent d'E. Rubinstein (Villejuif, France). L'anticorps anti-CD82 TS82b provient d'Abcam. L'anticorps anti-NS5 2F6/G11 provient de AUSTRAL biologicals. Les anticorps de chèvre marqués PE anti-rat et anti-souris, anti-CD81 JS81 et anti- β 1 proviennent de BD Pharmingen. L'anticorps contrôle M1 anti-FLAG provient de chez Sigma.

Infections. Les HCVcc utilisés dans cette étude sont basés sur la souche JFH1 (Wakita *et al.*, 2005) et contiennent les mutations d'adaptation CS, N6 (Delgrange *et al.*, 2007) et ont été modifiés afin d'exprimer l'épitope A4 dans la protéine d'enveloppe E1 (Goueslain *et al.*, 2009). Les HCVcc exprimant le gène de la *Gaussia*-Luciférase (JFH1/CSN6A4/5'C19Rluc2Aubi) ont été produits comme décrit précédemment (Delgrange *et al.*, 2007). Les cellules Huh-7 ont étéensemencées la veille dans des plaques 24 puits et infectées pendant 2h à 37°C en présence de milieu sans sérum. Les cellules ont ensuite été rincées et du milieu complet a été ajouté. Les cellules ont été lysées 30 ou 48h après infection et les activités luciférase ont été mesurées selon les recommandations du fabricant (Promega, kit Renilla Luciferase 1000 Assays System).

Les HCVcc n'exprimant pas de gène rapporteur (JFH1/CSN6A4) ont été produits comme décrit précédemment (Delgrange *et al.*, 2007). Les cellules Huh-7 ont étéensemencées la veille dans des plaques 24 puits et infectées pendant 2h à 37°C dans du milieu sans sérum. Les cellules ont ensuite été rincées et du milieu complet a été ajouté. Les niveaux d'infection ont été mesurés par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage anti-NS5.

Les infections avec les PsV HPV16 purifiés exprimant la *Firefly*-Luciférase (L. Florin, Mainz, Allemagne) ont été réalisées en plaques 96 puits sur des cellules 293TT ensemencées la veille. Les cellules ont été infectées pendant 2h à 37°C dans du milieu sans sérum. Les cellules ont été rincées et du milieu complet a été ajouté. Vingt-quatre heures après infection, les cellules ont été lysées et les activités luciférase mesurées selon les recommandations du fabricant (Promega, kit Luciferase 10-pack Assay System).

Test de neutralisation par des anticorps. Les cellules Huh-7 et 293TT ensemencées la veille en plaques 24 ou 96 puits ont été préincubées pendant 1h à 4°C avec 5 ou 30 µg d'anticorps (anti-CD81 (JS81), anti-CD82 (TS82b), anti-CD9 (SYB-1), anti-CD63 (TS63), anti-CD151 (11G5a), anti-Tspan8 (TS29.1) ou contrôle (M1). Le milieu a ensuite été changé et les cellules infectées soit avec des HCVcc exprimant la *Gaussia*-Luciférase, soit avec des PsV HPV16.

Transfection des siRNAs. 20 µl d'OptiMEM (Invitrogen) et 5 µl d'Oligofectamine (Sigma) ont été mélangés et incubés 5 minutes à température ambiante (RT). 5 µl de siRNA à 20 µM (Dharmacon, ON-TARGETplus SMART pool) ont été mélangés à 80 µl d'OptiMEM. 25 µl du premier mélange ont été ajoutés au second mélange et le tout incubé 20 minutes à RT. Les cellules ont ensuite été rincées avec de l'OptiMEM et 1 ml d'OptiMEM a été ajouté. A la fin de l'incubation, le mélange a été ajouté goutte à goutte sur les cellules Huh-7 ensemencées la veille en plaques 6 puits et incubées 6 heures à 37°C. Les cellules ont été rincées et du milieu DMEM complet a été ajouté. Les cellules ont été transférées le lendemain dans une nouvelle plaque 6 puits et à nouveau transfectées 48h après la première transfection. Les cellules ont été ensemencées en plaques 24 puits 24h après la deuxième transfection et infectées avec des HCVcc 24h plus tard. Les niveaux d'infections ont été évalués par cytométrie en flux.

Test de toxicité cellulaire. Afin d'évaluer la toxicité des différents siRNA utilisés, un test MTS/PMS (Promega) a été utilisé. Les cellules Huh-7 ont été ensemencées en plaques 96 puits et analysées 96h après la deuxième transfection de siRNA. Un mélange contenant 20 µl de réactif MTS/PMS et 100 µl de milieu DMEM complet a été ajouté. Les

cellules ont été incubées à 37°C et l'évolution de la densité optique à 490 nm a été mesurée.

Production des lentivecteurs et transduction. Les gènes des différentes tétraspanines ont été fusionnées à la GFP en N-terminal et clonées dans un vecteur pTrip provenant de C. Rice (Université de Rockefeller, Etats-Unis). Le plasmide contrôle pTrip-YFP provient également de C. Rice (Université de Rockefeller, Etats-Unis).

Pour produire les lentivecteur, les différentes constructions pTrip, phCMV-VSV-G et HIV-Gag-pol (C. Rice, Université de Rockefeller, Etats-Unis) ont été co-transfectées (à raison d'un ratio de 10/2/8 et de 1 µg d'ADN total dans un puits de plaque 6 puits) avec de l'Exgen500 (Euromedex), selon les recommandations du fabricant, dans des cellules 293Tensemencées la veille dans des plaques 6 puits coatées à la poly-D-Lysine. Six heures après transfection, le milieu a été remplacé par du milieu DMEM complet et les cellules ont été incubées à 32°C pendant 72h. Les surnageants ont ensuite été collectés et filtrés à 0,45 µM.

Des cellules Huh-7ensemencées la veille en plaques 24 puits ont été transduites pendant 4h à 37°C avec les lentivecteurs dilués au 1:4 dans du milieu sans sérum dans un volume total de 200 µl. Du milieu complet a ensuite été ajouté. Les cellules ont été à nouveau transduites 24h après, dans les mêmes conditions. Les cellules ont été transférées 24h plus tard dans des plaques 24 puits et infectées le lendemain avec des HCVcc exprimant ou non la *Gaussia*-Luciférase. Les niveaux d'infection ont été évalués par luminométrie ou cytométrie en flux 24h après infection.

Test de sensibilité aux LELs solubles. Les HCVcc ont été incubés pendant 1h à 37°C avec 10 µg/ml de LELs solubles des différentes tétraspanines provenant de P. Monk (Sheffield, UK). Les cellules Huh-7ensemencées la veille en plaques 24 puits ont ensuite été infectées pendant 2h à 37°C dans du milieu sans sérum et analysées par cytométrie en flux 30h plus tard.

Cytométrie en flux. Les niveaux d'expression des tétraspanines après silencing ou après transduction ont été analysés 48h après la deuxième transduction. Pour cela, les cellules ont été lavées dans du PBS 2% BSA (Bovine Serum Albumine, Euromedex) puis incubées avec les anticorps anti-CD81 (5A6), anti-CD82 (TS82b), anti-CD9 (SYB-1), anti-

CD63 (TS63), anti-CD151 (TS151), anti-Tspan8 (TS29.1), anti-mCD81 (MT81 ou MT81w) dans du PBS 2% BSA, pendant 1h à 4°C. Les cellules ont été rincées dans du PBS 2% BSA et incubées 30 min à 4°C avec les anticorps secondaires couplés à la PE. Les cellules ont ensuite été rincées dans du PBS 2% BSA et décrochées avec du PBS 2 mM EDTA. Les marquages ont été analysés avec un FACSCalibur. Pour les marquages anti-NS5, les cellules ont été traitées de la même façon mais perméabilisées au préalable avec du PBS 2% BSA contenant 0,05% de saponine (Sigma).

Microscopie confocale.

Des cellules Huh-7 ont été transduites par le lentivecteur exprimant CD151-GFP, comme décrit précédemment, puis marquées avec l'anticorps MT81w suivi d'anticorps anti-rat couplés à l'Alexa555. Les marquages ont été analysés à l'aide d'un microscope LSM710 équipé d'un objectif à immersion 63x/1.4.

Partie 3 :

*New insights into the understanding
of hepatitis C virus entry and cell-
to-cell transmission by using
ionophore Monensin A*

1

2 **New insights into the understanding of hepatitis C virus entry and cell-to-**
3 **cell transmission by using ionophore Monensin A**

4

5 Lucie Fénéant^a, Julie Potel^a, Catherine François^b, Famara Sané^c, Florian Douam^d, Sandrine
6 Belouzard^a, Noémie Calland^a, Thibaut Vausselin^a, Yves Rouillé^a, Véronique Descamps^b,
7 Thomas F. Baumert^e, Gilles Duverlie^b, Dimitri Lavillette^d, Didier Hober^c, Jean Dubuisson^a,
8 Czesław Wychowski^a, Laurence Cocquerel^{a,#}

9

10 ^a Molecular and Cellular Virology Laboratory, Center for Infection and Immunity of Lille,
11 University Lille Nord de France, CNRS UMR8204, INSERM U1019, Pasteur Institute of
12 Lille, Lille, France

13 ^b Virology Department, Amiens University Hospital, Amiens, France.

14 ^c Laboratoire de Virologie EA3610, Université Lille 2, CHRU Lille, Lille, France.

15 ^d CNRS-UMR5557, Microbial Ecology, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne,
16 France.

17 ^e Inserm U1110, Université de Strasbourg, Pôle Hépatogastro-entérologie, Hôpitaux Universitaires de
18 Strasbourg, Strasbourg, France.

19

20 Running head : New insights into HCV transmission

21

22 L.F. and J.P. contributed equally to this work

23 [#] Correspondence should be addressed to laurence.cocquerel@ibl.cnrs.fr

24

25 **ABSTRACT (246 words)**

26 In our study, we characterized the effect on the Hepatitis C Virus (HCV) life cycle of
27 Monensin, an ionophore that is known to raise the intracellular pH. We show that Monensin
28 inhibits HCV entry in a pangenotypic and dose-dependent manner. Monensin induces an
29 alkalization of intracellular organelles, leading to an inhibition of the fusion step between
30 viral and cellular membranes. Interestingly, we demonstrated that HCV cell-to-cell
31 transmission is dependent on the vesicular pH. Under the selective pressure of Monensin, we
32 selected a Monensin-resistant virus which has evolved to use a new entry route that is
33 probably pH- and clathrin-independent. Characterization of this mutant led to the
34 identification of two mutations in envelope proteins, Y297H in E1 and I399T in the
35 hypervariable region 1 (HVR1) of E2, which confer resistance to Monensin and thus allow
36 HCV to use a pH-independent entry route. Interestingly, the I399T mutation introduces a N-
37 glycosylation site within HVR1, increases the density of virions and their sensitivity to
38 neutralization with anti-apolipoprotein E (ApoE) antibodies, suggesting that this mutation
39 likely induces conformational changes in HVR1 that in turn modulate the association with
40 ApoE. Strikingly, the I399T mutation also abrogates HCV cell-to-cell spread. In conclusion,
41 we identified a mutation in HVR1 that overcomes the vesicular pH-dependence, modifies the
42 biophysical properties of particles and abolishes cell-to-cell transmission, indicating that the
43 regulation by HVR1 of particle association with ApoE might control the pH-dependence of
44 cell-free and cell-to-cell transmission. Thus, HVR1 and ApoE are critical regulators of HCV
45 propagation.

46

47 **IMPORTANCE**

48

49 Although several cell surface proteins have been identified as entry factors for Hepatitis C
50 Virus (HCV), precise mechanisms regulating its transmission into hepatic cells are still
51 unclear. In our study, we used Monensin A, an ionophore that is known to raise the
52 intracellular pH, and demonstrated that cell-free and cell-to-cell transmission are both pH-
53 dependent processes. We generated Monensin-resistant viruses that displayed different entry
54 routes and biophysical properties. Thanks to these mutants, we highlighted the importance of
55 the hypervariable region 1 (HVR1) in E2 envelope protein for the association of particles with
56 apolipoprotein E, which in turn might control the pH-dependency of cell-free and cell-to-cell
57 transmission.

58

59 INTRODUCTION

60 Hepatitis C virus (HCV) infection is a global public health problem affecting over 130
61 million individuals worldwide. Chronic HCV infection can result in liver cirrhosis and
62 hepatocellular carcinoma (1). While previous interferon-based therapies have been limited by
63 drug resistance and marked toxicity (2), the recently clinically licenced direct-acting antivirals
64 are expected to cure the large majority of infected patients without major adverse effects (3).
65 Nevertheless several challenges remain: high costs limit access to therapy even in high
66 resources settings, and certain subgroups difficult-to-treat patients may need adjunctive
67 therapeutic approaches (4). Furthermore, a vaccine is not available and vaccine development
68 is hampered by viral evasion of host immune responses (5).

69 HCV is a small enveloped single-strand RNA virus that belongs to the *Hepacivirus*
70 genus in the *Flaviviridae* family (6). This virus, which circulates in the bloodstream of
71 infected patients as lipoviral particles, mainly targets hepatocytes. Infection begins with the
72 attachment of the viral particle to the cell surface of the hepatocytes through attachment
73 factors and then proceeds to a complex multistep process involving a series of specific
74 cellular entry factors (reviewed in (7)). These molecules include the Scavenger Receptor class
75 B type I (SRB1) (8), the tetraspanin CD81 (9), the tight junction proteins CLDN1 (10) and
76 OCLN (11) and the receptor tyrosine kinases EGFR and EphA2 (12). More recently,
77 Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) cholesterol absorption receptor and the iron uptake
78 receptor transferrin receptor 1 (TfR1) have also been shown to play a role in HCV entry (13,
79 14). The interaction of HCV particles through their associated apolipoproteins and envelope
80 proteins (E1 and E2), with the different entry factors leads to the internalization of particles
81 via a clathrin-mediated endocytosis (15, 16) followed by the fusion at low pH with the
82 membrane of an early endosome (17, 18). Although these last years, the use of pseudotyped
83 viruses (HCVpp) (18, 19) and infectious cell culture-produced particles (HCVcc) (20-22)

84 have greatly advanced the knowledge of HCV lifecycle, the exact sequence of events leading
85 from HCV interaction with host factors at the plasma membrane to internalization and viral
86 fusion still remains elusive. In particular, cellular and viral actors involved in the fusion step
87 of cellular and viral membranes remain to be identified.

88 Beside transmission by circulating particles referred to as cell-free infection, HCV
89 particles can be transmitted directly into neighboring cells, so called cell-to-cell transmission.
90 This route of transmission was first suggested when infected cells foci were seen in infected
91 human livers by RNA imaging analysis (23) and recently confirmed using a similar approach
92 (24). Later on, it has been shown that HCV can be transmitted to neighboring cells in the
93 presence of monoclonal antibodies (mAbs) or patient-derived antibodies that are able to
94 neutralize virus-free infectivity (25-27). Recently, it has been proposed that exosomes from
95 HCV-infected cells were capable of transmitting infection to naïve human hepatoma cells (28,
96 29). Although several entry factors have been implicated in this process, the viral
97 determinants, entry factor requirements and molecular mechanisms involved in cell-to-cell
98 transmission route still need to be further characterized.

99 In our study, we used Monensin A to evaluate its anti-viral potential against HCV and
100 gain new insights into the understanding of HCV transmission. Monensin is a well-known
101 polyether antibiotic isolated from *Streptomyces cinnamomensis* (30) for which the structure
102 has been described (31). It exchanges specifically Na⁺ for H⁺, resulting in elevated cytosolic
103 Ca²⁺ concentration and pH (32). Monensin is used extensively in the beef and dairy
104 industries to prevent coccidiosis, enhance growth or prevent bloat (33-36).

105 We showed that Monensin efficiently inhibits cell-free and cell-to-cell transmissions
106 of HCV. Monensin induced an alkalization of intracellular organelles, probably leading to an
107 inhibition of the fusion step between viral and cellular membranes, indicating that both cell-
108 free and cell-to-cell transmissions required a fusion step in acidic compartments.

109 Interestingly, HCV resistant to Monensin (FL-8) but also to Chloroquine and Chlorpromazine
110 was selected by sequential passages in the presence of Monensin. Characterization of the FL-
111 8 mutant showed that resistance to Monensin was carried by two mutations in envelope
112 proteins, Y297H in E1 and I399T in the hypervariable region 1 (HVR1) of E2, which allow
113 HCV to use a pH-independent entry route. We further characterized these two mutations and
114 showed that they likely induce conformational changes in E2, increase the density of particles
115 and increase virus sensitivity to neutralization by anti-apolipoprotein E antibodies. Most
116 importantly, the I399T mutation abrogated cell-to-cell transmission indicating that we
117 describe for the first time a mutant of this transmission route.
118

119 **MATERIALS AND METHODS**

120 **Chemicals and cell culture.** Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Opti-MEM,
121 phosphate-buffered saline (PBS), Glutamax-I, non-essential amino acids (NEAA), goat and
122 fetal bovine serum (FBS) were from Invitrogen. 4'6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) was
123 purchased from Molecular Probes (Invitrogen). Monensin and Mowiol 3-88 were from
124 Calbiochem. Monensin was resuspended in ethanol at 100mM. Boceprevir was kindly
125 provided by Philippe Halfon (Hôpital Ambroise Paré, Marseille, France). Chlorpromazine
126 was from Alexis. Other Chemicals were from Sigma.

127 Huh-7 cells were described previously (37). Huh-7-Lunet-CD81-FLuc-BLR cells (38) were
128 kindly provided by T. Pietschmann (Twincore, Hanover, Germany). HEp-2 cells were
129 obtained from BioWhittaker.

130 **Antibodies.** Mouse anti-HCV E1 (A4, (39)) and anti-Yellow Fever Virus (YFV) envelope
131 (2D12, ATCC CRL-1689, (40)) monoclonal antibodies (mAb) were produced *in vitro* by
132 using a MiniPerm apparatus (Heraeus), as recommended by the manufacturer. The 3/11 (anti-
133 HCV E2, (41)) hybridoma was kindly provided by J. McKeating (University of Birmingham,
134 UK). Anti-CD81 mAb (5A6, (42)) was kindly provided by S. Levy (Stanford University,
135 USA). Anti-CD151 mAb (TS151, (43)) was kindly provided by E. Rubinstein (Inserm,
136 Villejuif, France). Anti-CLDN1 (OM 8A9-A3) mAb has been previously described (44).
137 AR3A and AR5A mAbs (anti-E2 and anti-E1E2, respectively) were kindly provided by M.
138 Law (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) (45). Anti-SRB1 (Cla1) and anti-
139 CD81 (JS81) mAbs were from BD Biosciences Pharmingen. Anti-EGFR (cocktail R19/48),
140 anti-OCN and anti-beta-tubulin were from Invitrogen. The polyclonal goat anti-ApoE
141 antibody was from Calbiochem. Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch
142 (West Grove, PA, USA).

143 **HCVcc and infection assays.** To produce HCVcc, we used a modified version of the plasmid
144 encoding JFH1 genome (genotype 2a; GenBank access number AB237837), kindly provided
145 by T. Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) (20). Huh-7 cells were
146 electroporated with *in vitro* transcribed RNA of JFH1 containing (HCVcc-Luc) or not
147 (HCVcc) the *Gaussia* luciferase reporter gene, or with the JFH1- Δ HVR1 construct (46), and
148 engineered to express A4 epitope (47) and titer-enhancing mutations (48). JFH1 stocks were
149 produced by further amplification in Huh-7 cells. The intergenotypic HCVcc chimeras
150 GT3a(S52)/JFH1 and GT5a(SA13)/JFH1, kindly provided by J. Bukh (University of
151 Copenhagen, Denmark) (49) were also used in this work.

152 For infection assays, HCVcc were added to Huh-7 cells (m.o.i.=1) seeded the day before in
153 24-well or 96-well plates and incubated for 2 h at 37°C. The supernatants were then removed
154 and the cells were incubated in DMEM 10% FBS at 37°C. At 24, 30 or 48 h post-infection,
155 *Renilla/Gaussia* luciferase assays were performed as indicated by the manufacturer (Promega)
156 or infection levels were detected by indirect immunofluorescence.

157 **HCVpp and infection assays.** HCVpp were produced as described previously (19, 50) with
158 plasmids kindly provided by B. Bartosch and F.L. Cosset (INSERM U758, Lyon, France).
159 The plasmids encoding HCV envelope glycoproteins of genotypes 1b (UKN1B-5.23), 2b
160 (UKN2B-1.1) and 4a (UKN4-11.1) were kindly provided by J. Ball (Nottingham University,
161 UK) (51). The genotype 1a plasmid (strain H) has been described previously (19) and the
162 genotype 2a plasmid (strain JFH1) was kindly provided by R. Bartenschlager (University of
163 Heidelberg, Germany). A plasmid encoding the feline endogenous virus RD114 glycoprotein
164 (52) was used for the production of RD114pp. Pseudotyped particles were inoculated on Huh-
165 7 cells for 2h at 37°C. At 24, 48 or 72 h post-infection, *Firefly* luciferase assays were
166 performed as indicated by the manufacturer (Promega).

167 **Other viruses.** We used the YFV strain 17D and a Sindbis virus expressing the *Firefly*
168 luciferase (SinV, Toto1101/Luc, (53), kindly provided by M. MacDonald, Rockefeller
169 University, NY, USA). The recombinant adenovirus expressing the GFP (AdV) was produced
170 as described (47). These viruses were inoculated on Huh-7 cells for 2h at 37°C and cultured
171 for 24h at 37°C. YFV infections were scored by indirect immunofluorescence, SinV and AdV
172 infections were scored by luminometry and flow cytometry, respectively.

173 The diabetogenic Coxsackievirus B4 (CVB4) E2 strain (provided by J-W. Yoon, Julia
174 McFarlane Diabetes Research Center, Calgary, Alberta, Canada) was produced in HEP-2
175 cells, as described (54). CVB4 infections were scored by evaluating the cytopathic effect at
176 48h post-infection. It has to be noted that no cytotoxicity of HEP-2 cells was induced by
177 Monensin at 0.1µM or 1µM.

178 **Indirect immunofluorescence microscopy.** Cells grown onto glass coverslips or in 96-well
179 plates were infected and processed for immunofluorescence detection of E1 envelope protein
180 with A4 mAb, as previously described (55). Cells were observed with a Zeiss Axiophot
181 equipped with a 10x magnification, 0.5 numerical aperture objective. Fluorescent signals
182 were collected with a Coolsnap ES camera (Photometrix) using specific fluorescence
183 excitation and emission filters. For quantification, images of randomly picked areas from each
184 coverslip or well were recorded and processed using ImageJ software. Cells labeled with anti-
185 E1 mAb A4 were counted as infected cells. The total number of cells was obtained from
186 DAPI-labeled nuclei. The infections were scored as the ratio of infected cells to total cells.

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

192 **Entry assay.** Cells seeded in 24-well plates were infected with HCVcc-Luc for 1h at 4°C
193 (attachment/binding period). Virus was removed, cells were washed with serum free medium
194 and incubated again for 1h at 4°C (post-attachment/binding period). Then cells were washed
195 and incubated for 1h at 37°C (endocytosis/fusion period). Finally, cells were washed and
196 incubated in 10% FBS culture medium for 21h. Infection levels were monitored by measuring
197 luciferase activities.

198 **Replication assay.** To control replication levels, Huh-7-Lunet-CD81-FLuc cells were
199 electroporated with a JFH1-RLuc RNA deleted for HCV envelope glycoprotein sequence
200 (JFH1-ΔE1E2-RLuc RNA) in Opti-MEM using the Gene Pulser apparatus (Bio-Rad). Cells
201 were next seeded in complete medium for 5h at 37°C. Monensin (0.1 μM or 1 μM) or
202 Boceprevir (0.5 μM) were added to the cells. Cells grown in the presence of ethanol and
203 DMSO were used as controls for Monensin and Boceprevir, respectively. At 24, 48 and 72h
204 post-electroporation, cells were lysed and tested for replication using a luciferase based assay
205 (Dual Luciferase Assay, Promega). F-luciferase activities were quantified to assess cell
206 density and viability whereas R-luciferase activities were quantified to assess HCV
207 replication.

208 **Assembly assay.** To test the ability of cells to assemble and produce infectious HCV
209 particles, Huh-7 cells seeded onto 6-well plates were infected with HCVcc for 2h at 37°C.
210 Then, virus was removed and cells cultured with Monensin (0.1 μM or 1 μM). In parallel,
211 HCV-infected Huh-7 cells were treated with brefeldin A (BFA; 0.1 μM or 1 μM) for 8 h
212 before harvest. Thirty hours later, supernatants were collected and infectivity titers were
213 determined by indirect immunofluorescence.

214 **Flow cytometry.** For CD81, SRB1, CLDN1, CD151 and EGFR staining, cells were cultured
215 with or without Monensin, labeled with TS81, Cla1, 8A9, TS151 or anti-EGFR antibodies,
216 respectively for 1h at 4°C. Cells were washed and incubated 45 minutes at 4°C with PE-

217 labeled secondary antibodies, rinsed again, and fixed with formalin solution. Labeled cells
218 were analyzed using a BD FACSCalibur cytometer.

219 **Detection of OCLN.** Huh-7 cells were cultured with or without Monensin, and lysed in PBS
220 containing 1% TX-100 and protease inhibitors (Complete, Roche Applied Science). Twenty-
221 four hours later, non-reducing Laemmli buffer was added and lysates were resolved by SDS-
222 PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare) and immunoblotted with
223 anti-OCLN antibody followed by peroxidase-conjugated secondary antibody.

224 **Colocalization of CD81 and CLDN1.** Colocalization analyses were carried out using the
225 CoLocalizer Pro software. Briefly, images representing a single optical Z-section of cells
226 were converted to tiffs and imported into CoLocalizer Pro software. Background corrections
227 were applied and the total number of pixels overlapping between the two different channels
228 was calculated. Colocalized pixels were divided by the total number of pixels for a chosen
229 channel (as indicated in figure legends), yielding percent colocalization. Colocalization values
230 from at least 10 cells were averaged to give mean percent colocalization.

231 **Monensin / interferon assay.** Huh-7 cells seeded on 24-well plates were incubated for 2h at
232 37°C in medium containing Monensin (0.04 μ M), Interferon (1 U/ml) or both. Cells were
233 then infected for 2h at 37°C with HCVcc-Luc in the presence of the drugs. After infection,
234 cells were incubated again in complete medium supplemented with Monensin, Interferon or
235 both drugs. Twenty-four hours post-infection, cells were lysed and luciferase activities were
236 quantified.

237 **Acridine orange stainings.** Huh-7 cells seeded on labteck wells were either left untreated or
238 treated for 2h or 24h with medium containing Monensin (0.1 or 1 μ M) or Bafilomycin A1
239 (25nM). Cells were then incubated for 20 min at 37°C with complete medium supplemented
240 with 5 μ g/ml Acridine Orange and stainings were analyzed immediately by confocal
241 microscopy.

242 **HCVcc cell-to-cell transmission assay.** Huh-7 cells were seeded on coverslips and infected
243 with HCVcc (JFH1 or mutants) for 2h at 37°C. Cells were then washed and cultured for 72h
244 at 37°C in culture medium containing or not the 3/11 mAb (50µg/ml) in the presence or in the
245 absence of Monensin (0.1µM) or Chloroquine (1.75µM). Then, cells were fixed with formalin
246 solution (formaldehyde 4%, Sigma), and foci detected using indirect immunofluorescence.

247 **Selection of Monensin-resistant viruses.** Supernatant of JFH1-infected cells were serially
248 passaged under increasing concentrations of Monensin (from 15 nM to 600 nM). The
249 structural region of HCV genome was amplified by RT-PCR and reintroduced in JFH1
250 plasmid by using AgeI/KpnI restriction enzymes. Several DNA clones were selected,
251 amplified and sequenced. Amino acid changes that arose during inhibitor selection were
252 identified by analysis of the DNA sequence, compared to the initial and control passages, in
253 the presence of ethanol. Plasmids were *in vitro* transcribed before electroporation in Huh-7
254 cells. Stocks of mutated viruses were generated as described before.

255 **Mutants of resistance to Monensin.** The Y297H mutant has been described previously (56).
256 Mutant viruses carrying the mutations I399T, Q409R or the combination of both, were
257 generated by directed mutagenesis on JFH1 encoding plasmid using fusion PCR. PCR
258 amplified segments carrying these mutations were introduced into the plasmid encoding the
259 JFH1 virus by using KpnI/BsiwI restriction enzymes. Plasmids were *in vitro* transcribed
260 before electroporation in Huh-7 cells. Viral Stocks were generated as described before.

261 **Neutralization assays.** For neutralization assays with AR3A, AR5A and JS81 antibodies,
262 viruses were mixed with antibodies and immediately used for inoculation of Huh-7 cells
263 seeded the day before in 96-well plates. At 2h post-inoculation, complete medium was added
264 to the cells, and at 30h post-infection, cells were fixed with methanol and processed for
265 immunofluorescence to measure infectivity. For neutralization assay with anti-ApoE

266 antibodies, viruses were incubated with the antibodies during 1h at 37°C before inoculation
267 on Huh-7 cells and then were treated as described above.

268 **Silencing experiments.** Huh-7 cells were transfected with small interfering RNA (siRNA)
269 pools (Dharmacon) targeting CD81 or SRB1 or a non-targeting siRNA control using
270 RNAiMax (Invitrogen) and according to the manufacturer's instructions. The knockdown
271 effects were determined at 72h after transfection by Western blotting at the time of virus
272 inoculation. The effects of receptor silencing on virus infection were determined 30h later by
273 indirect immunofluorescence.

274 **Density gradients.** One milliliter of supernatants containing viruses was layered on the top of
275 a 10-50% continuous iodixanol gradient (Optiprep, Proteogenix). Gradients were
276 ultracentrifuged for 16h at 160,000xg at 4°C in a SW41 rotor. Twelve fractions of 1 ml were
277 collected. The infectious titers were determined for each fraction.

278

279 **RESULTS**

280

281 **Monensin inhibits HCV infection**

282 To investigate a potential inhibitory effect of Monensin on HCV infectivity, we first studied
283 the capacity of JFH1-based *Gaussia* luciferase (GLuc) reporter HCVcc (HCVcc-Luc) to
284 infect Huh-7 cells in the presence of increasing amounts of Monensin. As shown in Fig. 1A,
285 infection levels decreased in a dose-dependent manner in the presence of Monensin,
286 indicating that Monensin inhibits HCVcc infection. Although some toxicity began to be
287 observed at 10 μ M, the concentrations of 0.1 and 1 μ M had no toxic effect, as measured by an
288 MTS assay (Fig. 1B). We therefore used the 0.1 and 1 μ M concentrations of Monensin in our
289 next experiments. The inhibition of HCV infection in Monensin-treated cells was confirmed
290 with an untagged JFH1 virus (data not shown). However, due to its greater technical ease,
291 HCVcc-Luc was used in most of the other experiments. Importantly, Monensin was active at
292 nanomolar concentrations since the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was
293 estimated to 25-45 nM (Fig. 1C). In addition, the combination of Monensin with IFN, a
294 known HCV inhibitor, led to an additive effect in inhibition of HCV infection (Fig. 1D).

295

296 **Monensin inhibits HCV entry**

297 To define which step of HCV lifecycle is inhibited by Monensin, it was added during 2 h at
298 different time points before, during, and after inoculation of Huh-7 cells with HCVcc-Luc
299 (Fig. 2A, b, c, d), or added full-time after inoculation (Fig. 2A, e), as previously described
300 (47, 57). Cells treated with ethanol (CTL) and cells treated with Monensin before, during, and
301 after infection (a) were used as controls. The results clearly showed that Monensin
302 significantly inhibits HCVcc infection when present during virus infection (Fig. 2A, c). There
303 was no effect of the drug if added as a pretreatment of cells (Fig. 2A, b) or post-infection (Fig.

304 2A, d, e). These results indicate that Monensin likely inhibits the entry step of HCV. To
305 confirm this hypothesis, we used in the same experimental conditions retroviral particles
306 pseudotyped with HCV envelope glycoproteins (HCVpp2a) or with the envelope protein of
307 the retrovirus RD114 (RD114pp), as a control (Fig. 2B). HCVpp2a infectivity was reduced by
308 80% when Monensin was present during infection (Fig. 2B, c). A slight decrease in HCVpp2a
309 infection was observed in condition b which is likely due to some residual Monensin acting
310 on the entry step (Fig. 2B, b). Similarly, the slight decrease observed in condition d is likely
311 related to Monensin acting on the entry of residual virions that have not yet completed the
312 final steps of the entry process (Fig. 2B, d). When cells were incubated full-time with
313 Monensin (Fig. 2B, a) or full-time after inoculation of viruses (Fig. 2B, e), a significant
314 decrease was measured for both pseudotypes indicating that a post-entry step of
315 pseudoparticle infection was blocked by Monensin. It has to be noted that HCVpp2a infection
316 was more strongly inhibited than that of RD114pp when Monensin was present full-time
317 during infection (Fig. 2B, a). Moreover, no inhibition was found when Monensin was added
318 after inoculation of HCVcc (Fig. 2A, d and e). Altogether, our results indicate that Monensin
319 inhibits the entry step of HCV. We next investigated whether Monensin has an antiviral
320 activity on HCVpp or intergenotypic HCVcc chimeras bearing envelope glycoproteins from
321 other genotypes (Fig. 2C and 2D). Monensin significantly inhibited infection of HCVpp
322 harboring envelope proteins from genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 4a, or 6a (Fig. 2C) and infection
323 of intergenotypic HCVcc chimeras bearing envelope proteins from genotypes 3a or 5a (Fig.
324 2D). Together, our data indicate that Monensin inhibits HCV entry in a genotype-independent
325 manner.

326

327

328

329 **Monensin does not inhibit HCV replication and egress.**

330 Although the above data indicate that Monensin strongly affects HCV entry, we could not
331 exclude additional effects on other steps of the HCV lifecycle. To analyze the effect of
332 Monensin on HCV replication, we used Lunet-CD81 cells, a Huh-7-derived cell clone
333 expressing the *Firefly* luciferase enzyme (FLuc) thus permitting assessment of cell density
334 and viability which is proportional to the level of FLuc expressed in the cells (38). Lunet-
335 CD81-FLuc cells were electroporated with *in vitro* transcribed assembly-defective JFH1-
336 Δ E1E2-Rluc RNA, to bypass the entry step, and avoid any interference with late steps of the
337 HCV life cycle. Boceprevir was used in parallel as a control of inhibition of viral replication.
338 As shown in Fig. 3A, Monensin had no effect on HCV replication, even after a long period of
339 treatment (72h post-electroporation).

340 To investigate whether Monensin impairs HCV assembly or secretion, Huh-7 cells were
341 infected with HCVcc for 2 h and then cultured with 0.1 or 1 μ M of Monensin. Brefeldin A
342 (BFA) was used in parallel as a control of inhibition of HCV release. Thirty hours later,
343 supernatants were collected and infectivity titers were determined by indirect
344 immunofluorescence. As shown in Fig. 3B, Monensin had no effect on HCVcc infectious
345 titers, indicating that this molecule does not affect egress of HCV.

346

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

348 Since we showed that Monensin blocks the entry step of HCV, we next wondered whether
349 Monensin would act directly on viral particles. For this purpose, HCVcc were preincubated
350 with 1 μ M of Monensin before contact with target cells and then diluted to 0.1 μ M during
351 viral inoculation. In these experimental conditions, if Monensin acts directly on virions, it
352 should have a stronger inhibitory effect on infection than the one observed with the same
353 concentration (1 μ M) during the inoculation, without preincubation, as described in Fig. 2A.

354 Otherwise, no inhibitory effect should be observed because the presence of 0.1 μM of
355 Monensin during viral inoculation does not significantly inhibit HCV infection (Fig. 4A, 0.1
356 CTL and data not shown). As shown in Fig. 4A, preincubation of virus with 1 μM of
357 Monensin did not significantly affect HCV infection demonstrating that Monensin does not
358 act on HCV particles.

359

360 **Monensin does not modulate HCV entry factors expression and localization**

361 HCV entry is a multistep process involving several cellular attachment and entry factors.
362 Therefore, we then determined whether Monensin inhibits HCV entry by modulating the
363 expression levels of aforementioned cellular factors. Huh-7 cells were treated with 0.1 μM or
364 1 μM of Monensin during 24 h and entry factors were analyzed by flow cytometry or western
365 blotting (WB). Cell surface expression levels of SRB1, CD81, CLDN-1 and EGF-R, for
366 which antibodies against extracellular domains are available, were analyzed by flow
367 cytometry. In contrast, OCLN, for which no such antibody is available, was analyzed by WB.
368 CD151, another tetraspanin not involved in HCV entry, was used as a control. As shown in
369 Fig. 4B, no significant effect of Monensin on the expression levels of HCV entry factors was
370 found, indicating that Monensin does not block HCV entry by affecting HCV entry factors
371 expression. Since it has been shown that CD81 and CLDN1 colocalize and interact in areas of
372 the plasma membrane to form a complex that is essential to HCV entry (58, 59), we also
373 performed colocalization studies, as previously described (60). As shown in Fig. 4C,
374 treatment of Huh-7 cells with different concentrations of Monensin did not affect the
375 colocalization of CD81 with CLDN-1.

376

377

378

379 Monensin inhibits a late step of HCV entry

380 After attachment to cell surface and binding to entry factors, HCV virions are internalized by
381 clathrin-mediated endocytosis (15, 16). Following internalization, HCV is transported to early
382 endosomes along actin stress fibers, where fusion seems to take place (16, 61). To determine
383 at which step HCV entry is impaired by Monensin, we administered Monensin at different
384 intervals during the early phase of infection. Virus attachment and binding were performed at
385 4°C (Fig. 5A, Steps 1 and 2), cells were then shifted to 37°C to allow endocytosis and fusion
386 (Fig. 5A, Step 3). Strikingly, the addition of Monensin during the third step led to a strong
387 inhibition of HCV infection, almost as strong as the one observed when Monensin was
388 present during the three steps. In contrast, no inhibition was observed when Monensin was
389 added during attachment/binding steps. Together, these results indicate that Monensin blocks
390 either the endocytosis or the fusion step of HCV entry.

391 Next, in order to define its activity spectrum and better understand the mechanism of action of
392 Monensin, we analyzed its antiviral activity against other viruses. We used Yellow Fever
393 Virus (YFV), another member of the *Flaviviridae* family and Sindbis virus (SinV), which is
394 unrelated to HCV but is an enveloped virus believed to exploit the same entry route as HCV.
395 In addition, we used the human Adenovirus-5 (AdV), a non-enveloped pH-independent virus
396 (62) that enters cells via clathrin-mediated endocytosis and the Coxsackie Virus B4 (CVB4),
397 a non-enveloped virus for which the entry mechanism is not well defined but is believed to be
398 pH-independent involving in part clathrin-mediated endocytosis. For all infections, Monensin
399 at 0.1 µM or 1 µM was added 2 h before infection and kept during and after viral inoculation
400 (Fig. 5B). Interestingly, Monensin led to a strong inhibition of YFV infection at both
401 concentrations, even stronger than the one observed on HCV (Fig. 5B). Moreover, Monensin
402 at 0.1 µM barely reduced SinV infection whereas it abrogated SinV infection when used at 1
403 µM. On the other hand, no reduction was observed on AdV and CVB4 infections (Fig. 5B).

404 Collectively, these results indicate that (i) Monensin can affect other members of the
405 *Flaviviridae* family and other enveloped viruses, (ii) Monensin does not interfere with non-
406 enveloped virus infection, (iii) Monensin does not substantially affect clathrin-mediated viral
407 endocytosis and (iv) the antiviral activity of Monensin is likely related to its effect on
408 membrane fusion by acting on endosome acidification.

409 Next, we analyzed the effect of Monensin on organelle acidification in Huh-7 cells. Acridine
410 Orange (AO) was used to test for acidic organelles. It is a weakly basic fluorescent probe that
411 emits green at low concentrations and gives a red fluorescence at high concentrations. AO
412 accumulates in acidic compartments where it oligomerizes and fluoresces. In contrast,
413 alkalization of the endocytic structure with Bafilomycin A1 is accompanied by a change in
414 the AO fluorescence (63, 64). Indeed, as shown in Fig. 6, AO produced a highly punctuated
415 red staining in Huh-7 cells. In contrast, the addition of Bafilomycin A1 for 2 h or 24 h led to a
416 drastic decrease of red AO fluorescence. Interestingly, this effect was also observed in Huh-7
417 cells treated with Monensin at 1 μ M during 2 h or 24 h, indicating that the treatment of Huh-7
418 cells with Monensin leads to an alkalization of intracellular organelles. Therefore, the
419 antiviral activity of Monensin is likely related to its effect on organelle acidification. It has to
420 be noted that Huh-7 cells treated with Monensin at 0.1 μ M during 24 h showed an
421 intermediate AO staining, which was likely due to the fact that Monensin is probably no
422 longer effective at this concentration after 24 h of incubation, in addition its effect is rapidly
423 reversed (data not shown and (65)).

424

425 **HCV cell-to-cell transmission is a pH-dependent process**

426 As described previously, in addition to cell-free infection, HCV can also propagate by cell-to-
427 cell transmission. Since cell-to-cell transmission has been suggested to be an important route
428 of transmission for HCV (25), we next analyzed the effect of Monensin on this process. For

429 this purpose, Huh-7 cells were infected with HCVcc for 2 h and then cultured with
430 neutralizing anti-E2 antibody (3/11) in the presence or in the absence of Monensin (0.1 μ M
431 and 1 μ M). Three days post-infection, foci were visualized by immunofluorescence (Fig. 7A)
432 and sizes of foci were measured by counting the number of cells per focus. Our results
433 showed that Monensin at 0.1 μ M led to a strong reduction of the number of cells per focus
434 (Fig. 7B) whereas Monensin at 1 μ M totally inhibits HCV transmission (data not shown).
435 These results indicate that cell-to-cell transmission is likely dependent on the vesicular pH.
436 To strengthen this hypothesis, we treated cells with Chloroquine (CQ), a lysosomotropic
437 weak base that inhibits acidification of lysosomes and endosomes. As shown in Fig. 7,
438 Chloroquine also led to a strong inhibition of the number of cells per focus, indicating that it
439 abrogates HCV cell-to-cell transmission. Together, these results indicate that cell-to-cell
440 transmission of HCV is a pH-dependent process.

441

442 **Selection of a Monensin-resistant virus.**

443 To further investigate the mechanism of action of Monensin, we next aimed to select
444 Monensin-resistant viruses by propagating HCVcc for several passages in the presence of
445 increasing concentrations of Monensin (JFH1-Mon). Passages were performed in parallel
446 with virus cultured in the presence of corresponding amounts of ethanol (JFH1-EtOH). After
447 25 passages, both viral stocks were used to infect naïve Huh-7 cells in the presence of
448 Monensin during viral inoculation. Interestingly, viruses amplified in the presence of
449 Monensin (JFH1-Mon) were 2.5 fold more resistant to increasing concentrations of Monensin
450 than control viruses (JFH1-EtOH) (Fig. 8A). Total RNAs were extracted from cells infected
451 with JFH1-Mon or JFH1-EtOH and viral genomes were amplified by RT-PCR and
452 sequenced. We identified several mutations in E1 and E2 JFH1-Mon sequences, which were
453 not found in JFH1-EtOH or JFH1wt sequences. We next replaced the JFH1 DNA fragment

454 corresponding to the structural HCV proteins with that of JFH1-Mon. Several JFH1-Mon
455 DNA clones carrying different combinations of mutations in E1 and E2 were selected, *in vitro*
456 transcribed and electroporated into Huh-7 cells to generate viral clone stocks carrying
457 different combinations of mutations. The analysis of their resistance toward Monensin
458 showed that one clone, named FL-8, was resistant to Monensin, as compared to JFH1 (data
459 not shown and Fig. 8B). Thus, our results suggest that we generated HCV particles enable to
460 enter target cells by a pH-independent entry route. To confirm this assumption, we next
461 assayed the capacity of JFH1-Mon and FL-8 viruses to infect Huh-7 cells in the presence of
462 Chloroquine, which is a widely used molecule for the treatment of malaria and exerts
463 inhibitory effects against several RNA viruses including HCV (15, 66, 67). As shown in Fig.
464 8C and Fig. 8D, JFH1-Mon and FL-8 viruses were able to infect Huh-7 cells in the presence
465 of increasing concentrations of Chloroquine, whereas infection by control viruses (JFH1-
466 EtOH and JFH1) was dramatically reduced. Together, these results indicate that we managed
467 to select viruses that use an entry route that is less dependent on the acidic endosomal pH.
468 HCV enters target cells through clathrin-mediated endocytosis followed by the fusion at low
469 pH with the membrane of an early endosome (15-18). Since we generated HCV particles that
470 were pH-independent for their entry, we next studied whether their endocytosis was still
471 dependent on clathrin-coated pits. Huh-7 cells were pretreated for 30 min with
472 chlorpromazine (5 µg/ml), an inhibitor of clathrin assembly at the plasma membrane, and then
473 infected with FL-8 or JFH1 viruses (Fig. 8E). Chlorpromazine dramatically reduced JFH1
474 infection levels, as previously described (15). Surprisingly, the FL-8 virus was only partially
475 inhibited by chlorpromazine, indicating that a fraction of this virus can potentially enter cells
476 independently of clathrin-mediated endocytosis.

477 Collectively, our results indicate that under the selective pressure of Monensin, we selected
478 HCV particles that have evolved to use a new entry route that appearsto be less dependent on
479 clathrin and endosomal pH.

480

481 **Characterization of the Y297H and I399T mutations.**

482 The FL-8 clone displayed several mutations in envelope glycoproteins, two mutations in E1
483 and three mutations in the HVR1 of E2 (Table 1). The E1 Y297H mutation has been
484 previously described in viruses cultivated in the presence of Ferroquine but did not confer any
485 resistance to this drug (56). The E1 V343A mutation was on a non-conserved amino acid
486 frequently found as an A in other genotypes. The E2 I399T mutation potentially introduced a
487 N-glycosylation site in HVR1, the E2 S404G mutation was on a residue that is conserved
488 among genotypes and the E2 Q409R mutation was on a glutamine residue that is totally
489 conserved among genotypes (Table 1). We made the hypothesis that adaptive mutation(s)
490 involved in the pH independence of the FL-8 virus were likely on highly or totally conserved
491 residue(s). Therefore, the Y297H mutation in E1 and the I399T and Q409R mutations in E2
492 were introduced into JFH1 strain by reverse genetics (Table 1). However, introduction of
493 Q409R mutation alone or in combination with the I399T led to the production of non
494 infectious viruses (Table 1). Additional mutations are likely necessary to compensate the
495 effect of the Q409R mutation and generate infectious particles. In contrast, Y297H and I399T
496 mutants were infectious and showed a significant resistance to Monensin (Fig. 9A), as
497 compared to JFH1 virus. The Y297H and I399T mutations were able to confer the same or a
498 stronger (I399T) level of resistance to Monensin than FL-8 virus, which carries several
499 adaptive mutations. Together, these results indicate that resistance to Monensin maps to E1
500 and E2 envelope proteins on Y297 and I399 amino acids, respectively.

501 As described previously, the I399T mutation generates a N-V-T sequon in HVR1 that might
502 be used for the addition of a N-glycan on N397 (Fig. 9B). Interestingly, the presence of this
503 additional glycosylation site was confirmed by the change in the migration profile of E2
504 bearing the I399T mutation (Fig. 9B, FL-8 and I399T), as compared to wild type E2 (Fig. 9B,
505 JFH1).

506 Since mutations in envelope glycoproteins can affect HCV sensitivity to antibody
507 neutralization and modulate the use of entry factors (68), we next tested the mutants in
508 antibody neutralization assays. We first used AR3A and AR5A, two well-characterized mAbs
509 (69). AR3A is an anti-E2 conformation-sensitive human antibody recognizing a discontinuous
510 epitope located within the CD81 binding site whereas AR5A mAb recognizes a discontinuous
511 epitope on E1E2, which does not interfere with CD81 binding (45). As shown in Fig. 9C, the
512 I399T mutation reduced the sensitivity of the virus to neutralization with low concentrations
513 of AR3A and AR5A mAbs, as compared to JFH1, whereas the Y297H mutation had no
514 effect. The FL-8 mutant virus was also less neutralized by AR3A and AR5A Mabs, which is
515 likely due to the presence of the I399T mutation in this virus. These results indicate that the
516 I399T mutation likely induces some conformational changes in the E2 structure, possibly in
517 the CD81 binding site. The use of an anti-CD81 mAb in neutralization assay (Fig. 9C, JS81)
518 showed that the Y297H mutation likely also leads to conformational changes in the E2
519 structure, since neutralization of the Y297H virus was significantly reduced, as compared to
520 JFH1 virus. Unexpectedly, the FL-8 mutant carrying both mutations did not show any
521 significant difference in neutralization with JS81 mAb. Together, our results suggest that the
522 interaction between E2 and CD81 might be different in the context of the I399T and Y297H
523 mutations. However, CD81 remains an essential entry factor for viruses carrying these
524 mutations since the silencing of CD81 totally abrogates their infection (Fig. 9D).

525 HVR1 is a region of E2 involved in viral immune escape and use of SRB1 and CD81 (8, 70).
526 It also plays a role in virus infectivity by modulating the association of viral particles with
527 apolipoproteins (46, 70-73). In this context, we sought to determine if the I399T and Y297H
528 mutations, which likely induce conformational changes in the E2 structure, would affect the
529 usage of SRB1 and association with apolipoproteins. We used a panel of anti-SRB1
530 antibodies in neutralization assays (data not shown) but we did not get any significant
531 neutralization of infection. We next analyzed the effect of silencing SRB1 expression on
532 infectivity of mutated viruses. As shown in Fig. 9D, virus infectivity of mutants was reduced
533 at the same level as for the JFH1, indicating that the I399T and Y297H mutations do not
534 affect SRB1 usage. In contrast, when we used anti-apolipoprotein E (ApoE) antibodies in
535 neutralization assay (Fig. 9C), we found that neutralization of I399T and FL-8 viruses was
536 significantly increased, as compared to JFH1 virus. These results indicate that, as described
537 for viruses lacking HVR1 (Δ HVR1) (73), the I399T mutation might modulate the association
538 of viral particles with ApoE. In agreement with this, the density of infectious viral particles
539 bearing the I399T mutation, analyzed by density gradient ultracentrifugation, was increased
540 (Fig. 10) with a peak of infectivity at a density of 1.12 g/ml, as compared to JFH1 virus that
541 produces infectious particles with a density of 1.08 g/ml. Interestingly, the density of
542 infectious particles produced from the I399T, FL-8 and Δ HVR1 viruses was strictly identical
543 (1.12 g/ml), whereas the density of Y297H particles was slightly lower (1.11 g/ml). Together,
544 these results indicate that the I399T mutation in HVR1 leads to the production of viral
545 particles with a higher density.

546

547 **The I399T mutation in HVR1 abrogates HCV cell-to-cell transmission**

548 We showed above that cell-to-cell transmission of HCV is likely a pH-dependent process.
549 Therefore, we next sought to determine the levels of cell-to-cell transmission for the

550 Monensin-resistant viruses, which use a pH-independent cell-free entry route. Huh-7 cells
551 were infected with JFH1, FL-8, I399T and Y297H viruses for 2h and then cultured in the
552 presence of anti-E2 neutralizing antibody 3/11. Three days post-infection, foci were
553 visualized by immunofluorescence (Fig. 11A) and sizes of foci were measured by counting
554 the number of cells per focus. Surprisingly, we found that cell-to-cell transmission of viruses
555 bearing the I399T mutation was totally abrogated (Fig. 11B) and the transmission of Y297H
556 mutant was highly reduced. Together, these data show that the I399T mutation, which
557 introduces a N-glycan in HVR1, abolishes the viral cell-to-cell spread, indicating that HVR1
558 plays a major role in this process.
559

560 **DISCUSSION**

561 The aim of this study was to characterize the effect of Monensin A on the HCV
562 lifecycle and gain new insights into the understanding of HCV transmission. We show that
563 Monensin inhibits HCV infection in a dose-dependent manner by blocking the entry step.
564 Indeed, Monensin leads to an alkalization of intracellular organelles in Huh-7 cells that affects
565 a late step of entry, probably the fusion step between viral and cellular membranes, which is
566 known to be pH-dependent. In addition to the inhibition of cell-free transmission, Monensin
567 also inhibits cell-to-cell transmission, demonstrating for the first time that this process is
568 dependent on the vesicular pH. Interestingly, by long-term culture of HCV in the presence of
569 increasing concentrations of Monensin, we selected viruses that were resistant to Monensin
570 but also to Chloroquine and Chlorpromazine. These adapted viruses evolved to use a new
571 entry route that is probably less dependent on clathrin and endosomal pH. We identified two
572 mutations, Y297H in E1 and I399T in E2 HVR1 that enable HCV to enter target cells in a
573 pH-independent manner. The characterization of Monensin-resistant mutants showed that the
574 Y297H and I399T mutations likely induce conformational changes in E2 structure and
575 modify association of viral particles with lipoproteins. Most strikingly, we found that the
576 I399T mutation in HVR1 totally abolishes the cell-to-cell transmission pathway.

577 Due to Monensin toxicity in humans (74, 75), it will be difficult to use Monensin as a
578 new therapeutic treatment against HCV. However, as shown in this study, Monensin is a
579 valuable tool to analyze the late steps of HCV entry i.e. membrane fusion. In addition, due to
580 a broad spectrum of biological activities, Monensin derivatives are a major focus of drug
581 development aiming at reducing the toxicity and to obtain new compounds with improved
582 efficacy. In particular, certain derivatives such as urethanes of Monensin seem promising (76-
583 78). Thus, it will be of interest to evaluate the anti-HCV activity of Monensin-derivatives in
584 the future.

585 Enveloped viruses enter cells either by direct fusion at the plasma membrane or by receptor-
586 mediated endocytosis. For a large number of retroviruses, penetration into the cytoplasm of
587 the target cell occurs directly at the plasma membrane by a fusion mechanism triggered
588 through the interaction of viral envelope proteins with their cognate receptors. In contrast, for
589 numerous viruses such as Influenza or SinV, following attachment to receptors on the cell
590 surface, the virus-receptor complex is internalized via clathrin-coated pits and delivered to
591 intracellular vesicles of the endosomal compartment. In these vesicles, the acidic environment
592 induces a conformational change in the viral fusogenic envelope glycoproteins, which is
593 believed to expose a hydrophobic domain that interacts with the endosomal membrane. This
594 interaction leads to the fusion between cellular and viral membranes delivering the
595 nucleocapsid into the cytosol. Such a mechanism is likely used by HCV. Indeed, it has been
596 demonstrated that virions enter target cells by clathrin-mediated endocytosis (15) and that
597 fusion occurs in the early endosomes (16). The use of vacuolar acidification inhibitors ((15-
598 18, 79-81) and this study) showed that HCVcc and HCVpp entry is pH-dependent, indicating
599 that the acidic pH of endosome triggers the fusion machinery likely by inducing
600 conformational changes in E1E2 envelope glycoproteins. However, exposure of cell surface-
601 bound HCV to acidic pH followed by a return to neutral pH does not affect viral infectivity
602 (16, 17). In addition, Tscherne *et al.* have shown that low-pH-triggered entry of HCVcc
603 requires an incubation at 37°C, indicating that productive HCV entry needs
604 interactions/processes that do not occur at 4°C (17). These data indicate that HCV envelope
605 proteins require a priming event, which occurs at 37°C, to become sensitive to low pH.
606 Concurring with this, it has been shown that HCV pretreatment with the large extracellular
607 loop (LEL) of CD81 enhances infectivity, induces conformational changes in E1 and E2,
608 allows E2 binding to liposomes, irreversibly inactivates particles at low pH in the absence of
609 a target membrane, and leads to the fusion with the plasma membrane of permissive cells at

610 acidic pH, indicating that CD81 plays a central role in HCV entry by priming HCV for low
611 pH-dependent conformational changes (79). In accordance with studies described above, our
612 results show that HCV entry is inhibited by Monensin, a Na⁺/H⁺ exchanging ionophore that
613 raises cytosolic Ca²⁺ concentration and pH. Importantly, we demonstrated that Monensin
614 blocks HCV infection with maximal potency when added during the first hour of shift at
615 37°C, after the 4°C post-attachment/binding step. Almost complete insensitivity to Monensin
616 was achieved about two hours after infection, indicating that at this time almost all particles
617 have undergone fusion and reached the cytosol. The use of Monensin on infection with
618 viruses from different families indicated that Monensin does not block internalization but
619 rather acts on the fusion machinery, likely by inducing an alkalization of intracellular
620 organelles, as demonstrated by Acridine orange staining. Importantly, we demonstrated that
621 Monensin as well as Chloroquine block the cell-to-cell transmission route of HCV, for which
622 precise mechanisms need to be defined. Our data indicate that cell-free and cell-cell
623 transmission of HCV may share common mechanisms involving a pH-dependent fusion step
624 between cellular and viral membranes.

625 Up to now, the mechanism mediating HCV fusion has not been elucidated and the
626 precise role played by E1E2 envelope proteins in membrane fusion needs to be defined. It has
627 been suggested that the fusion mechanism occurring for other *Flaviviridae* viruses may apply
628 to HCV. The use of vacuolar acidification inhibitors ((15-18, 79-81) and this study) showed
629 that HCV_{cc} and HCV_{pp} entry is pH-dependent, thus allowing HCV RNA delivery into
630 cytoplasm, supporting the hypothesis of similar fusion mechanisms between HCV and other
631 *Flaviviridae* viruses. Indeed, the HCV envelope glycoproteins have long been assumed to
632 belong to class II fusion proteins based on the fact that HCV is a member of the *Flaviviridae*
633 family. In addition, some amino acids in E1 (262-290) and E2 (416-430, 504-522 and 604-
634 624) were identified as important for fusion (82, 83). However, the structure of E2 core

635 protein (excluding the HVR1) has been recently solved and showed that E2 core structure has
636 an architecture made of a central β sandwich flanked by front and back layers consisting of
637 loops, helices, and β sheets. E2 has a compact globular shape that does not fit the highly
638 extended three-domain class II fusion fold (84, 85). These new data strongly suggest that E1
639 should be the fusion protein or, at least, a fusion partner of an E1E2 fusion complex formed
640 upon conformational rearrangements (83, 86). The results of our study concur with this
641 hypothesis. From the FL-8 mutant, we identified two residues, one in E1 and one in E2
642 HVR1, which when mutated lead to a pH-independent entry route. The mutation Y297H in
643 E1 did confer resistance to Monensin, indicating that this residue is able by itself to modify
644 the HCV entry process or at least pH requirements. Interestingly, this mutation also appeared
645 following the use of Ferroquine, an analog of Chloroquine with weak base properties (87) that
646 modifies fusogenic properties of E1E2 (56). Together, this suggests that the residue Y297 in
647 E1 might be involved in the fusion process, possibly by acting in concert with other residues
648 in E1 and/or E2. Concurring with this, we identified an additional mutation in E2 HVR1 that
649 also confers resistance to Monensin. This I399T mutation generates a N-V-T sequon that is
650 used for the addition of a N-glycan on N397 in HVR1. This additional post-translational
651 modification likely leads to conformational changes in HVR1 and/or other regions in E2.
652 Thus, residues in E1 and in the HVR1 of E2 likely play a role in the fusion process. HVR1
653 might therefore contribute to the E2 folding rearrangement that likely occurs during the fusion
654 step. The Y297H and I399T mutations might induce conformational changes in envelope
655 protein(s) similar to those that occur in acidic compartments, and allow entry in a pH-
656 independent manner. Interestingly, we found that the FL-8 mutant was also able to infect cells
657 in the presence of chlorpromazine, indicating that this mutant likely uses an alternative entry
658 route that is less dependent on vesicular pH- and clathrin-coated pits. It has to be noted that a
659 clathrin-independent but still pH-dependent entry route has been very recently described (88).

660 Thus, under the selective pressure of Monensin, we generated viral particles that adapted and
661 managed to use a new entry route.

662 Beside its involvement in immune escape, HVR1 is involved in use of SRB1 and
663 conceals the viral CD81 binding site (8, 70). In addition, HVR1 plays a role in virus
664 infectivity (70-72) by modulating the association of viral particles with apolipoproteins
665 notably ApoE (73). In our study, we showed that the Y297H mutation and more significantly
666 the I399T mutation, increase neutralization with anti-ApoE antibodies. These results indicate
667 that the I399T mutation might reduce the incorporation levels of ApoE into particles. Another
668 possibility would be that ApoE may display different conformation and/or epitope exposure
669 in the presence of the I399T mutation and therefore different sensitivity to antibodies, as
670 described recently for Jc1 particles lacking HVR1 (73), but incorporating ApoE at similar
671 levels in JFH1 and mutated viruses. In addition, we observed that the I399T mutation
672 abrogates cell-to-cell spread, a transmission pathway for which it has been shown that ApoE
673 incorporated into particles plays a major role (89). Combined with our observation that the
674 I399T mutation confers pH-independence for viral entry, our results suggest that the
675 association levels of lipids and ApoE with viral particles might regulate the pH-dependent
676 fusion process during HCV entry. Further studies would be necessary to test this hypothesis.

677 In conclusion, the use of Monensin allowed us to demonstrate that cell-free and cell-to
678 cell transmission are both pH-dependent pathways, likely by sharing common mechanisms.
679 We identified two Monensin-resistance mutations, Y297H in E1 and I399T in E2 HVR1 that
680 leads to the addition of a N-glycan in HVR1. These mutations enable viruses to enter their
681 target cells in a pH-independent manner likely through changes in the conformation of E1E2
682 envelope proteins. Our results suggest that the I399T mutation in HVR1 likely decreases the
683 association of particles with ApoE. Importantly, this mutation abrogates cell-to-cell
684 transmission. Taken together, our results indicate that the regulation by HVR1 of particle

685 association with lipids, notably ApoE, might control the pH-dependence of cell-free and cell-
686 to-cell transmission. Thus, HVR1 and ApoE incorporated into the viral particles are critical
687 regulators of HCV transmission (Fig. 12).

688

689 **ACKNOWLEDGMENTS**

690 We thank S. Ung and A. Pillez for their technical assistance. We are grateful to S. Levy, J.
691 McKeating, E. Rubinstein, T. Pietschmann, J. Bukh, T. Wakita, J. Ball, M. MacDonald, J-W.
692 Yoon, J. McFarlane for providing us with reagents. We thank the BioImaging Center Lille-
693 Nord de France for access to the instruments. This work was supported by the “Agence
694 Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales” (ANRS). L.F., N.C. and T.V.
695 were supported by a fellowship from ANRS. L.F., J.P., N.C. and T.V. were supported by a
696 fellowship from the French Ministry of Research. S.B. was supported by a Marie
697 Curie International Reintegration Grant (PIRG-GA-2009-256300).

698

699 **FIGURE LEGENDS**

700

701 **Figure 1: Monensin inhibits HCV infection.** (A) Huh-7 cells were infected with HCVcc-
702 Luc in presence of 0.001% ethanol (EtOH) or increasing concentrations of Monensin added in
703 the medium 2h before infection, 2h during infection and full-time after infection. After 24h of
704 infection, cells were lysed and luciferase activity quantified. (B) Monensin toxicity was
705 assayed on Huh-7 cells. Cells were cultured with increasing concentrations of Monensin and
706 viability was tested using an MTS-based viability assay at 2 and 24h post-treatment. (C) To
707 assess the EC50 of Monensin on HCV infection, Huh-7 cells were pre-treated with Monensin
708 2h before, 2h during and full-time after infection with HCVcc-Luc. Cell lysates were analysed
709 24h post-infection for luciferase activity. (D) Cells were incubated for 2h at 37°C in medium
710 containing Monensin (0.04 µM), Interferon (1 U/ml) or both. Cells were then infected for 2h
711 at 37°C with HCVcc-Luc in presence of the drugs. After infection, cells were incubated again
712 in complete medium supplemented with Monensin, Interferon or both together. Twenty-four
713 hours post infection, cells were lysed and luciferase activity was quantified. Results are
714 presented as mean ± SD of at least three independent experiments. ** and *** mean a *p* value
715 below 0.01 and 0.001 respectively.

716

717 **Figure 2: Monensin impairs HCV entry.** Huh-7 cells were infected with HCVcc-Luc (A),
718 RD114pp or HCVpp2a (B) for 2h at 37°C and treated at different time points with 1µM
719 Monensin. Monensin was added full-time during the experiment (a), 2h before infection (b),
720 2h during infection (c), 2h after infection (d) or full-time after infection (e). (C) Huh-7 cells
721 were infected with HCVpp harboring envelope glycoproteins from the indicated genotypes or
722 with RD114pp, in the presence or in the absence of 1µM Monensin. To avoid the nonspecific
723 effect of Monensin on the post-entry step of pseudoparticles, Monensin was only added 2 h

724 during inoculation of pseudoparticles or chimeras, as described in B, c. Cells were then
725 cultured for 72h at 37°C. (D) Huh-7 cells were infected with intergenotypic chimeras
726 harboring envelope glycoproteins from genotypes 3a or 5a in the presence (as in B, a) or in
727 the absence of 1µM Monensin. Cells were then cultured for 30h at 37°C. In A, B and C,
728 infection levels were quantified by luminometry whereas in D infection levels were quantified
729 by flow cytometry. Results are presented as mean ± SD of three independent experiments. *,
730 ** and *** mean *p* values below 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

731

732 **Figure 3: Monensin does not affect HCV replication and secretion.** (A) Huh-7-Lunet-
733 CD81-FLuc cells were electroporated with JFH1-ΔE1E2-RLuc RNA, cultured 5h at 37°C in
734 complete culture medium, and then treated with Monensin (0.1 µM or 1 µM) or Boceprevir
735 (0.5 µM). Cells treated with ethanol (solvent of Monensin) or DMSO (solvent of Boceprevir)
736 were used as controls (CTL). Cells were lysed at 24, 48 and 72h post-electroporation. F-
737 luciferase activities were quantified to assess cell density and viability and R-luciferase
738 activities were quantified to assess HCV replication. R-luciferase activities were normalized
739 with F-luciferase activities (B) Huh-7 cells were infected with HCVcc. Two hours later, virus
740 was removed and replaced by culture medium containing Monensin at indicated
741 concentrations. In parallel, HCV-infected Huh-7 cells were treated with brefeldin A (BFA) for
742 8 h before harvest. Supernatants were collected 36h post-infection and used to infect naïve
743 Huh-7 cells. Titers were determined 40h later by indirect immunofluorescence. Results are
744 presented as mean ± SD of three independent experiments. * and ** mean *p* values below
745 0.05 and 0.01, respectively.

746

747

748 **Figure 4: Monensin affects neither viral particles nor HCV receptor expression levels.**

749 (A) Huh-7 cells were infected with HCVcc-Luc (diluted 10 times) in the presence of 0.5 or
750 0.1 μ M Monensin, or with HCVcc-Luc pre-treated for 1h at 37°C with 0.5 or 1 μ M of
751 Monensin and then diluted 10 times, to reach the final concentration of 0.5 and 0.1 μ M during
752 infection, respectively. (B) Huh-7 cells were treated with 0 (CTL), 0.1 or 1 μ M of Monensin
753 and stained for SRB1, CD81, CLDN-1, EGF-R and CD151 with corresponding mAbs.
754 Expression levels were analysed by flow cytometry and results are presented as percentages
755 of the CTL condition for each protein. OCLN levels were analyzed by western blotting (WB
756 OCLN). Results of histograms in panels A and B are presented as mean \pm SD of three
757 independent experiments. (C) Huh-7 cells were cultured with the indicated concentrations of
758 Monensin and fixed after 24h. Cells were labelled with TS81 anti-CD81 and 8A9 anti-
759 CLDN1 mAbs followed by secondary antibodies conjugated with Alexa488 (green staining)
760 and Alexa555 (red staining) respectively. Colocalization was calculated as the number of
761 yellow pixels (green and red pixels) over the number of yellow + red pixels, using
762 CoLocalizer Pro software.

763

764 **Figure 5: Monensin inhibits HCV entry at a late step and enveloped viruses infection.**

765 (A) Huh-7 cells were infected with HCVcc-Luc for 1h at 4°C (Step 1: attachment/binding),
766 then virus was removed and cells incubated again at 4°C for 1h (Step 2: post
767 attachment/binding). Finally, cells were shifted at 37°C for 1h (Step 3: endocytosis/fusion)
768 and left at 37°C for 21h. Monensin was added at 1 μ M either during the Step 1, Step 2, Step 3
769 or Steps 1-2-3. (B) Huh-7 or HEp-2 cells (for CVB4) were infected with indicated viruses in
770 presence of 0 (CTL), 0.1 or 1 μ M of Monensin added in the medium 2h before, during
771 infection and full-time after infection. HCV and SinV infections were scored by luminometry.

772 YFV and AdV infections were scored by indirect immunofluorescence, and flow cytometry,
773 respectively. CVB4 infections were scored by evaluating the cytopathic effect.

774

775 **Figure 6: Monensin leads to an alkalization of intracellular organelles.** Huh-7 cells were
776 treated for 2h or 24h with Monensin (0.1 or 1 μ M), Bafilomycin A1 (25 nM) or left untreated
777 (CTL). After incubation with AO, cells were observed by confocal microscopy.

778

779 **Figure 7: Monensin blocks cell-to-cell transmission.** Huh-7 cells were seeded on coverslips
780 and infected with HCVcc for 2h at 37°C. Cells were then washed and cultured for 72h at
781 37°C in culture medium containing the 3/11 neutralizing mAb (50 μ g/ml) in presence or in
782 absence of Monensin at 0.1 μ M. Foci of infected cells were detected using A4 anti-E1 indirect
783 immunofluorescence. The number of infected cells per focus was determined in the presence
784 of 0 (CTL) or 0.1 μ M Monensin and results are presented in panel B. *** means a *p* value
785 below 0.001.

786

787 **Figure 8: Generation of Monensin-resistant mutant viruses.**

788 Supernatants of JFH1-infected Huh-7 cells were serially passaged in the presence of
789 increasing concentrations of Monensin (JFH1-Mon) or in the presence of EtOH (JFH1-
790 EtOH), to generate viruses resistant to Monensin. Viral RNAs were extracted from both
791 populations and structural region was amplified by RT-PCR and reintroduced into wild type
792 JFH1 virus to generate viral clones carrying different combinations of adaptive mutations.
793 FL-8 is one of these clones. Mutant viruses carrying mutations found in FL-8 (I399T and
794 Y297H) were generated. (A) Huh-7 cells were pretreated for 2h with Monensin and then
795 infected with amplified viral populations for 2h in the presence of Monensin or EtOH (CTL).
796 Cells were then incubated for 30 h in complete medium supplemented with Monensin at

797 indicated concentrations. (B) Huh-7 cells were infected with JFH1 or FL-8 as described in A.
798 (C) Huh-7 cells were pretreated for 2h with Chloroquine at indicated concentrations and then
799 infected with JFH1-EtOH or JFH1-Mon viral populations for 2h in the presence of
800 Chloroquine. Cells were then incubated for 30 h in complete medium supplemented with
801 Chloroquine or H₂O (CTL). (D) Huh-7 cells were infected with JFH1 or FL-8 as described in
802 C. (E) Huh-7 cells were pretreated for 30min with Chlorpromazine (5 µg/ml) and then
803 infected with JFH1 or FL-8 for 2h in the presence of Chlorpromazine or H₂O (CTL). Cells
804 were then incubated for 30 h in complete medium supplemented with Chlorpromazine.
805 Results are presented as mean ± SD of three independent experiments. *, ** and *** mean *p*
806 values below 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

807

808 **Figure 9: Characterization of the Y297H and I399T mutations.**

809 FL-8 clone was sequenced and two major mutations, Y297H and I399T were identified and
810 cloned by fusion PCR into wild-type JFH1. (A) Huh-7 cells were pretreated for 2 h with
811 Monensin and then infected with mutant viruses for 2 h in the presence of Monensin or EtOH
812 (CTL). Cells were then incubated for 30 h in complete medium supplemented with Monensin
813 at indicated concentrations. (B) Top, amino acid sequences of HVR1 of JFH1 and I399T
814 viruses. Bottom, 8% SDS-PAGE of infected cell lysates followed by 3/11 western blotting.
815 The dashed line allows to evaluate the shift in migration profile, which is due to the presence
816 of an additional N-glycosylation site in E2 HVR1 of FL-8 and I399T viruses. (C) Viruses
817 were incubated on Huh-7 cells with AR3A, AR5A, recognizing conformational epitopes in
818 E2 and E1E2 heterodimers respectively, and anti-CD81 (JS81) antibodies at indicated
819 concentrations for 2 h in complete medium. For anti-ApoE antibodies, viruses were
820 preincubated for 1 h at 37°C with the antibodies at indicated concentrations before infection
821 in the presence of the antibodies. Cells were then incubated for 30 h in complete medium.

822 Infection levels were quantified by indirect immunofluorescence. (D) SRB1 and CD81
823 expression were downregulated by siRNA. A non-targeting siRNA was used as a control.
824 Knockdown efficiency in Huh-7 cells was determined by western blotting with anti-SRB1
825 and anti-CD81 antibodies 72 h after transfection. Anti- β -tubulin antibody was used as a
826 loading control. Cells were infected 72 h after transfection for 2 h in serum free medium.
827 Cells were then washed and incubated for 30 h in complete medium. Virus infectivity was
828 measured by immunofluorescence. Results are presented as mean \pm SD of three independent
829 experiments. *, ** and *** mean p values below 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

830

831 **Figure 10: Mutations lead to an increase of the viral particle density.** One milliliter of
832 supernatants containing viruses was layered on an iodixanol gradient and was ultracentrifuged
833 for 16h at 160,000xg at 4°C. Twelve fractions were collected and their density was measured.
834 The JFH1- Δ HVR1 virus was used as a positive control for increase density particles.
835 Fractions were titered and results are expressed for each fraction as the percentage of the total
836 viruses in the gradient. Results are presented as mean \pm SD of three independent experiments.

837

838 **Figure 11: Monensin-resistance mutations inhibit cell-to-cell transmission.** Huh-7 cells
839 were seeded on coverslips and infected with JFH1 or mutated viruses for 2h at 37°C. Cells
840 were then washed and cultured for 72h at 37°C in culture medium containing the 3/11
841 neutralizing mAb (50 μ g/ml). (A) Foci of infected cells were detected using A4 indirect
842 immunofluorescence. (B) The number of infected cells per focus was determined for each
843 virus. *** means a p value below 0.001.

844

845 **Figure 12 : New insights into HCV transmission.** Monensin inhibits cell-free and cell-to-
846 cell transmissions, indicating that they are both pH-dependent pathways. By long-term culture

847 of HCV in the presence of increasing concentrations of Monensin, we selected viruses that
848 were resistant to Monensin. This resistance was conferred by two mutations, Y297H in E1
849 and I399T in E2 HVR1 that leads to the addition of a N-glycan in HVR1. These mutations
850 likely induce changes in the conformation of E1E2 envelope (Env) proteins and enable viral
851 particles to enter their target cells in a pH-independent manner. The I399T mutation in HVR1
852 likely decreases the association of viral particles with ApoE that is characterized by an
853 increased sensitivity to neutralization by anti-ApoE antibodies and a higher density of viral
854 particles. Strikingly, the I399T mutation abrogates cell-to-cell transmission. Overall, our
855 results suggest that the regulation by HVR1 of particle association with lipids, and notably
856 ApoE, might control the pH-dependence of cell-free and cell-to-cell transmissions. Thus,
857 HVR1 and ApoE incorporated into the viral particles are critical regulators of HCV
858 transmission.

859

860

861

862 **Table 1:** E1 and E2 amino acid changes that emerged under the selective pressure of
 863 Monensin

864

	Amino acid changes					Infectious virus	Monensin resistance
	E1		E2 (HVR1)				
FL-8	Y297H ¹	V343A ²	I399T ³	S404G ⁴	Q409R ⁵	Yes	Yes
Y297H	Y297H	-	-	-	-	Yes	Yes
I399T	-	-	I399T	-	-	Yes	Yes
Q409R	-	-	-	-	Q409R	No	ND
I+Q	-	-	I399T	-	Q409R	No	ND

865

866 ¹ Mutation previously described in viruses cultured in the presence of Ferroquine (56).

867 ² Non conserved amino acid - A in other genotypes.

868 ³ Highly conserved amino acid - I399T introduces a N-glycosylation site in HVR1.

869 ⁴ Conserved amino acid.

870 ⁵ Amino acid that is totally conserved among genotypes.

871

872

873 REFERENCES

874

- 875 1. **Lemon SM, Walker C, Alter MJ, Yi M.** 2007. Hepatitis C Virus, pp. 1253–1304. *In*
876 Knipe, DM (ed.), *Fields VIROLOGY* Fifth. Lippincott Williams & Wilkins.
- 877 2. **Tai AW, Chung RT.** 2009. Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-
878 response. *Journal of Hepatology* **50**:412–420.
- 879 3. **Pawlotsky J-M.** 2014. New Hepatitis C therapies: The Toolbox, Strategies, and
880 Challenges. *Gastroenterology* 1–17.
- 881 4. **Chung RT, Baumert T-F.** 2014. Curing chronic hepatitis C--the arc of a medical
882 triumph. *N Engl J Med* **370**:1576–1578.
- 883 5. **Baumert T-F, Fauvelle C, Chen DY, Lauer GM.** 2014. A prophylactic hepatitis C
884 virus vaccine: a distant peak still worth climbing. *Journal of Hepatology* **61**:S34–44.
- 885 6. **Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM.** *Flaviviridae: The Viruses and Their*
886 *Replication*, pp. 1101–1152. *In* Knipe, DM, Howley, PM (eds.), *Virology* Fifth.
887 Lippincott Williams & Wilkins.
- 888 7. **Fénéant L, Levy S, Cocquerel L.** 2014. CD81 and Hepatitis C Virus (HCV) Infection.
889 *Viruses* **6**:535–572.
- 890 8. **Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni**
891 **C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A.** 2002. The human scavenger receptor class B type
892 I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* **21**:5017–5025.
- 893 9. **Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ,**
894 **Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S.** 1998. Binding of hepatitis C virus to
895 CD81. *Science* **282**:938–941.
- 896 10. **Evans MJ, Hahn von T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou**
897 **T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM.** 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-
898 receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**:801–805.
- 899 11. **Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, De Jong YP, Rice CM.**
900 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of
901 mouse cells. *Nature* **457**:882–886.
- 902 12. **Lupberger J, Zeisel M-B, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, Mee**
903 **CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J,**
904 **Cosset F-L, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Doffoel M,**
905 **Raffelsberger W, Poch O, McKeating JA, Brino L, Baumert T-F.** 2011. EGFR and
906 EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral
907 therapy. *Nat Med* **17**:589–595.
- 908 13. **Sainz B, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA,**
909 **Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL.** 2012. Identification of the Niemann-
910 Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor.
911 *Nat Med* **18**:281–285.
- 912 14. **Martin DN, Uprichard SL.** 2013. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis
913 C virus entry factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**:10777–10782.
- 914 15. **Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C,**
915 **Rouille Y.** 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J*
916 *Virol* **80**:6964–6972.
- 917 16. **Meertens L, Bertaux C, Dragic T.** 2006. Hepatitis C virus entry requires a critical
918 postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J*
919 *Virol* **80**:11571–11578.
- 920 17. **Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM.**
921 2006. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-
922 triggered entry. *J Virol* **80**:1734–1741.

- 923 18. **Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA.** 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:7271–7276.
- 924
- 925
- 926 19. **Bartosch B, Dubuisson J, Cosset F-L.** 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-
927 particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.*
928 **197**:633–642.
- 929 20. **Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K,**
930 **Habermann A, Kräusslich H-G, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ.** 2005.
931 Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome.
932 *Nat Med* **11**:791–796.
- 933 21. **Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF,**
934 **Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV.** 2005. Robust hepatitis C virus infection in
935 vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:9294–9299.
- 936 22. **Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC,**
937 **Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM.** 2005. Complete
938 replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**:623–626.
- 939 23. **Chang M, Williams O, Mittler J, Quintanilla A, Carithers RL, Perkins J, Corey**
940 **L, Gretch DR.** 2003. Dynamics of hepatitis C virus replication in human liver. *Am. J.*
941 *Pathol.* **163**:433–444.
- 942 24. **Wieland S, Makowska Z, Campana B, Calabrese D, Dill MT, Chung J, Chisari**
943 **FV, Heim MH.** 2014. Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon
944 stimulated gene expression in infected human liver. *Hepatology* **59**:2121–2130.
- 945 25. **Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV, Timpe**
946 **JM, Krieger SE, Baumert T-F, Tellinghuisen TL, Wong-Staal F, Balfe P,**
947 **McKeating JA.** 2011. Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell
948 transmission. *J Virol* **85**:596–605.
- 949 26. **Timpe JM, Stamataki Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, Schwarz A,**
950 **Desombere I, Roels GL, Balfe P, McKeating JA.** 2008. Hepatitis C virus cell-cell
951 transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology*
952 **47**:17–24.
- 953 27. **Catanese MT, Loureiro J, Jones CT, Dorner M, Hahn von T, Rice CM.** 2013.
954 Different Requirements for Scavenger Receptor Class B Type I in Hepatitis C Virus
955 Cell-Free versus Cell-to-Cell Transmission. *J Virol* **87**:8282–8293.
- 956 28. **Ramakrishnaiah V, Thumann C, Fofana I, Habersetzer F, Pan Q, de Ruiter PE,**
957 **Willemsen R, Demmers JAA, Stalin Raj V, Jenster G, Kwekkeboom J, Tilanus**
958 **HW, Haagmans BL, Baumert T-F, van der Laan LJW.** 2013. Exosome-mediated
959 transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc. Natl.*
960 *Acad. Sci. U.S.A.* **110**:13109–13113.
- 961 29. **Bukong TN, Momen-Heravi F, Kodys K, Bala S, Szabo G.** 2014. Exosomes from
962 Hepatitis C Infected Patients Transmit HCV Infection and Contain Replication
963 Competent Viral RNA in Complex with Ago2-miR122-HSP90. *PLoS Pathog*
964 **10**:e1004424.
- 965 30. **Haney ME, Hoehn MM.** 1967. Monensin, a new biologically active compound. I.
966 Discovery and isolation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **7**:349–352.
- 967 31. **Agtarap A, Chamberlin JW, Pinkerton M, Steinrauf L.** 1967. The structure of
968 monensic acid, a new biologically active compound. *J. Am. Chem. Soc.* **89**:5737–5739.
- 969 32. **Mollenhauer HH, Morré DJ, Rowe LD.** 1990. Alteration of intracellular traffic by
970 monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim Biophys Acta*
971 **1031**:225–246.
- 972 33. **Meinert RA, Yang CM, Heinrichs AJ, Varga GA.** 1992. Effect of monensin on

- 973 growth, reproductive performance, and estimated body composition in Holstein heifers.
974 *J. Dairy Sci.* **75**:257–261.
- 975 34. **Zinn RA, Plascencia A, Barajas R.** 1994. Interaction of forage level and monensin in
976 diets for feedlot cattle on growth performance and digestive function. *J. Anim. Sci.*
977 **72**:2209–2215.
- 978 35. **Goodrich RD, Garrett JE, Gast DR, Kirick MA, Larson DA, Meiske JC.** 1984.
979 Influence of monensin on the performance of cattle. *J. Anim. Sci.* **58**:1484–1498.
- 980 36. **Haberkorn A.** 1996. Chemotherapy of human and animal coccidiosis: state and
981 perspectives. *Parasitol. Res.* **82**:193–199.
- 982 37. **Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J.** 1982. Growth of human
983 hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium.
984 *Cancer Res* **42**:3858–3863.
- 985 38. **Gentzsch J, Hinkelmann B, Kaderali L, Irschik H, Jansen R, Sasse F, Frank R,
986 Pietschmann T.** 2011. Hepatitis C virus complete life cycle screen for identification of
987 small molecules with pro- or antiviral activity. *Antiviral Research* **89**:136–148.
- 988 39. **Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM.** 1994.
989 Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein
990 complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* **68**:6147–
991 6160.
- 992 40. **Schlesinger JJ, Brandriss MW, Monath TP.** 1983. Monoclonal antibodies
993 distinguish between wild and vaccine strains of yellow fever virus by neutralization,
994 hemagglutination inhibition, and immune precipitation of the virus envelope protein.
995 *Virology* **125**:8–17.
- 996 41. **Cocquerel L, Meunier JC, Pillez A, Wychowski C, Dubuisson J.** 1998. A retention
997 signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the
998 transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol* **72**:2183–2191.
- 999 42. **Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S.** 1990. TAPA-1, the target of an
1000 antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol. Cell.*
1001 *Biol.* **10**:4007.
- 1002 43. **Charrin S, Le Naour F, Oualid M, Billard M, Faure G, Hanash SM, Boucheix C,
1003 Rubinstein E.** 2001. The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and
1004 characterization of the complexes. *J Biol Chem* **276**:14329–14337.
- 1005 44. **Fofana I, Krieger SE, Grunert F, Glauben S, Xiao F, Fafi-Kremer S, Soulier E,
1006 Royer C, Thumann C, Mee CJ, McKeating JA, Dragic T, Pessaux P, Stoll-Keller
1007 F, Schuster C, Thompson J, Baumert T-F.** 2010. Monoclonal anti-claudin 1
1008 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes.
1009 *Gastroenterology* **139**:953–64, 964.e1–4.
- 1010 45. **Giang E, Dorner M, Prentoe JC, Dreux M, Evans MJ, Bukh J, Rice CM, Ploss A,
1011 Burton DR, Law M.** 2012. Human broadly neutralizing antibodies to the envelope
1012 glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**:6205–
1013 6210.
- 1014 46. **Xu Y, Martinez P, Séron K, Luo G, Allain F, Dubuisson J, Belouzard S.** 2015.
1015 Characterization of hepatitis C virus interaction with heparan sulfate proteoglycans. *J*
1016 *Virol* in press.
- 1017 47. **Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, Roingeard P, Descamps V, Duverlie G,
1018 Ciczora Y, Wychowski C, Dubuisson J, Rouille Y.** 2010. Identification of GBF1 as a
1019 cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **84**:773–787.
- 1020 48. **Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouille Y, Dubuisson J, Wakita
1021 T, Duverlie G, Wychowski C.** 2007. Robust production of infectious viral particles in
1022 Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen*

- 1023 Virol **88**:2495–2503.
- 1024 49. **Gottwein JM, Scheel TKH, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML,**
1025 **Hoegh AM, Bukh J.** 2009. Development and characterization of hepatitis C virus
1026 genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I
1027 and effect of antiviral drugs. *Hepatology* **49**:364–377.
- 1028 50. **Op De Beeck A, Voisset C, Bartosch B, Ciczora Y, Cocquerel L, Keck Z, Fong S,**
1029 **Cosset F-L, Dubuisson J.** 2004. Characterization of functional hepatitis C virus
1030 envelope glycoproteins. *J Virol* **78**:2994–3002.
- 1031 51. **Lavillette D, Tarr AW, Voisset C, Donot P, Bartosch B, Bain C, Patel AH,**
1032 **Dubuisson J, Ball JK, Cosset F-L.** 2005. Characterization of host-range and cell entry
1033 properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology*
1034 **41**:265–274.
- 1035 52. **Sandrin V, Boson B, Salmon P, Gay W, Nègre D, Le Grand R, Trono D, Cosset F-**
1036 **L.** 2002. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein
1037 show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes
1038 and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* **100**:823–832.
- 1039 53. **Bick MJ, Carroll J-WN, Gao G, Goff SP, Rice CM, MacDonald MR.** 2003.
1040 Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. *J Virol*
1041 **77**:11555–11562.
- 1042 54. **Chehadeh W, Kerr-Conte J, Pattou F, Alm G, Lefebvre J, Wattré P, Hober D.**
1043 2000. Persistent infection of human pancreatic islets by coxsackievirus B is associated
1044 with alpha interferon synthesis in beta cells. *J Virol* **74**:10153–10164.
- 1045 55. **Rocha-Perugini V, Montpellier C, Delgrange D, Wychowski C, Helle F, Pillez A,**
1046 **Drobecq H, Le Naour F, Charrin S, Levy S, Rubinstein E, Dubuisson J, Cocquerel**
1047 **L.** 2008. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE*
1048 **3**:e1866.
- 1049 56. **Vausselin T, Calland N, Belouzard S, Descamps V, Douam F, Helle F, François C,**
1050 **Lavillette D, Duverlie G, Wahid A, Fénéant L, Cocquerel L, Guérardel Y,**
1051 **Wychowski C, Biot C, Dubuisson J.** 2013. The antimalarial ferroquine is an inhibitor
1052 of hepatitis C virus. *Hepatology* **58**:86–97.
- 1053 57. **Calland N, Albecka A, Belouzard S, Wychowski C, Duverlie G, Descamps V,**
1054 **Hober D, Dubuisson J, Rouille Y, Séron K.** 2012. (–)-Epigallocatechin-3-gallate is a
1055 new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology* **55**:720–729.
- 1056 58. **Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, Davis C, Reynolds GM, Jennings A, Hu K,**
1057 **Yuan F, Deng H, Hubscher SG, Han JH, Balfe P, McKeating JA.** 2008. CD81 and
1058 claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* **82**:5007–5020.
- 1059 59. **Harris HJ, Davis C, Mullins JGL, Hu K, Goodall M, Farquhar MJ, Mee CJ,**
1060 **McCaffrey K, Young S, Drummer H, Balfe P, McKeating JA.** 2010. Claudin
1061 association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *Journal of Biological Chemistry*
1062 **285**:21092–21102.
- 1063 60. **Potel J, Rassam P, Montpellier C, Kaestner L, Werkmeister E, Tews BA,**
1064 **Couturier C, Popescu C-I, Baumert T-F, Rubinstein E, Dubuisson J, Milhiet P-E,**
1065 **Cocquerel L.** 2013. EWI-2wint promotes CD81 clustering that abrogates Hepatitis C
1066 Virus entry. *Cell. Microbiol.* **15**:1234–1252.
- 1067 61. **Coller KE, Berger KL, Heaton NS, Cooper JD, Yoon R, Randall G.** 2009. RNA
1068 interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS*
1069 *Pathog* **5**:e1000702.
- 1070 62. **Suomalainen M, Luisoni S, Boucke K, Bianchi S, Engel DA, Greber UF.** 2013. A
1071 Direct and Versatile Assay Measuring Membrane Penetration of Adenovirus in Single
1072 Cells. *J Virol* **87**:12367–12379.

- 1073 63. **Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y.** 1991. Bafilomycin
1074 A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and
1075 protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem* **266**:17707–17712.
- 1076 64. **Harada M, Shakado S, Sakisaka S, Tamaki S, Ohishi M, Sasatomi K, Koga H,**
1077 **Sata M, Tanikawa K.** 1997. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of V-type H+
1078 ATPases, inhibits the acidification of endocytic structures and inhibits horseradish
1079 peroxidase uptake in isolated rat sinusoidal endothelial cells. *Liver* **17**:244–250.
- 1080 65. **Maxfield FR.** 1982. Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of
1081 endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J Cell Biol* **95**:676–681.
- 1082 66. **Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S.** 2011. Lysosomotropic
1083 agents as HCV entry inhibitors. *Virology* **8**:163.
- 1084 67. **Mizui T, Yamashina S, Tanida I, Takei Y, Ueno T, Sakamoto N, Ikejima K,**
1085 **Kitamura T, Enomoto N, Sakai T, Kominami E, Watanabe S.** 2009. Inhibition of
1086 hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J*
1087 *Gastroenterol* **45**:195–203.
- 1088 68. **Grove J, Nielsen S, Zhong J, Bassendine MF, Drummer HE, Balfe P, McKeating**
1089 **JA.** 2008. Identification of a residue in hepatitis C virus E2 glycoprotein that
1090 determines scavenger receptor BI and CD81 receptor dependency and sensitivity to
1091 neutralizing antibodies. *J Virol* **82**:12020–12029.
- 1092 69. **Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamataki Z, Gastaminza P,**
1093 **Chisari FV, Jones IM, Fox RI, Ball JK, McKeating JA, Kneteman NM, Burton**
1094 **DR.** 2007. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus
1095 quasispecies challenge. *Nat Med* **14**:25–27.
- 1096 70. **Bankwitz D, Steinmann E, Bitzegeio J, Ciesek S, Friesland M, Herrmann E, Zeisel**
1097 **M-B, Baumert T-F, Keck Z-Y, Fong SKH, Pécheur E-I, Pietschmann T.** 2010.
1098 Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the
1099 CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol* **84**:5751–
1100 5763.
- 1101 71. **Prentoe J, Jensen TB, Meuleman P, Serre SBN, Scheel TKH, Leroux-Roels G,**
1102 **Gottwein JM, Bukh J.** 2011. Hypervariable Region 1 Differentially Impacts Viability
1103 of Hepatitis C Virus Strains of Genotypes 1 to 6 and Impairs Virus Neutralization. *J*
1104 *Virology* **85**:2224–2234.
- 1105 72. **Dao Thi VL, Granier C, Zeisel MB, Guerin M, Mancip J, Granio O, Penin F,**
1106 **Lavillette D, Bartenschlager R, Baumert TF, Cosset FL, Dreux M.** 2012.
1107 Characterization of Hepatitis C Virus Particle Subpopulations Reveals Multiple Usage
1108 of the Scavenger Receptor BI for Entry Steps. *Journal of Biological Chemistry*
1109 **287**:31242–31257.
- 1110 73. **Bankwitz D, Vieyres G, Hueging K, Bitzegeio J, Doepke M, Chhatwal P, Haid S,**
1111 **Catanese MT, Zeisel MB, Nicosia A, Baumert TF, Kaderali L, Pietschmann T.**
1112 2014. Role of Hypervariable Region 1 for the Interplay of Hepatitis C Virus with Entry
1113 Factors and Lipoproteins. *J Virol* **88**:12644–12655.
- 1114 74. **Kouyoumdjian JA, Morita MP, Sato AK, Pissolatti AF.** 2001. Fatal rhabdomyolysis
1115 after acute sodium monensin (Rumensin) toxicity: case report. *Arq Neuropsiquiatr*
1116 **59**:596–598.
- 1117 75. **Caldeira C, Neves WS, Cury PM, Serrano P, Baptista MA, Burdmann EA.** 2001.
1118 Rhabdomyolysis, acute renal failure, and death after monensin ingestion. *Am. J.*
1119 *Kidney Dis.* **38**:1108–1112.
- 1120 76. **Lowicki D, Huczyński A.** 2013. Structure and Antimicrobial Properties of Monensin
1121 A and Its Derivatives: Summary of the Achievements. *BioMed Research International*
1122 **2013**:1–14.

- 1123 77. **Westley JW, Liu CM, Evans RH, Sello LH, Troupe N, Hermann T.** 1983.
1124 Preparation, properties and biological activity of natural and semisynthetic urethanes of
1125 monensin. *J. Antibiot.* **36**:1195–1200.
- 1126 78. **Tanaka R, Nagatsu A, Mizukami H, Ogihara Y, Sakakibara J.** 2001. Studies on
1127 chemical modification of monensin IX. Synthesis of 26-substituted monensins and
1128 their Na⁺ ion transport activity. *Chem. Pharm. Bull.* **49**:711–715.
- 1129 79. **Sharma NR, Mateu G, Dreux M, Grakoui A, Cosset F-L, Melikyan GB.** 2011.
1130 Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *Journal of*
1131 *Biological Chemistry* **286**:30361–30376.
- 1132 80. **Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E,**
1133 **Cortese R, Nicosia A, Cosset F-L.** 2003. Cell entry of hepatitis C virus requires a set
1134 of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J*
1135 *Biol Chem* **278**:41624–41630.
- 1136 81. **Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T,**
1137 **Bartenschlager R.** 2006. Characterization of the Early Steps of Hepatitis C Virus
1138 Infection by Using Luciferase Reporter Viruses. *J Virol* **80**:5308–5320.
- 1139 82. **Krey T, d'Alayer J, Kikuti CM, Saulnier A, Damier-Piolle L, Petitpas I,**
1140 **Johansson DX, Tawar RG, Baron B, Robert B, England P, Persson MAA, Martin**
1141 **A, Rey FA.** 2010. The Disulfide Bonds in Glycoprotein E2 of Hepatitis C Virus Reveal
1142 the Tertiary Organization of the Molecule. *PLoS Pathog* **6**:e1000762.
- 1143 83. **Lavillette D, Pécheur E-I, Donot P, Fresquet J, Molle J, Corbau R, Dreux M,**
1144 **Penin F, Cosset F-L.** 2007. Characterization of fusion determinants points to the
1145 involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane
1146 fusion process of hepatitis C virus. *J Virol* **81**:8752–8765.
- 1147 84. **Khan AG, Whidby J, Miller MT, Scarborough H, Zatorski AV, Cygan A, Price**
1148 **AA, Yost SA, Bohannon CD, Jacob J, Grakoui A, Marcotrigiano J.** 2014. Structure
1149 of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature*
1150 **509**:381–384.
- 1151 85. **Kong L, Giang E, Nieuwma T, Kadam RU, Cogburn KE, Hua Y, Dai X, Stanfield**
1152 **RL, Burton DR, Ward AB, Wilson IA, Law M.** 2013. Hepatitis C Virus E2
1153 Envelope Glycoprotein Core Structure. *Science* **342**:1090–1094.
- 1154 86. **Douam F, Thi VLD, Maurin G, Fresquet J, Mompelat D, Zeisel M-B, Baumert T-**
1155 **F, Cosset F-L, Lavillette D.** 2014. A critical interaction between E1 and E2
1156 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell
1157 entry. *Hepatology* **59**:776–788.
- 1158 87. **Biot C, Taramelli D, Forfar-Bares I, Maciejewski LA, Boyce M, Nowogrocki G,**
1159 **Brocard JS, Basilico N, Olliaro P, Egan TJ.** 2005. Insights into the Mechanism of
1160 Action of Ferroquine. Relationship between Physicochemical Properties and
1161 Antiplasmodial Activity. *Mol. Pharmaceutics* **2**:185–193.
- 1162 88. **Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y,**
1163 **Suzuki T, Wakita T.** 2014. Alternative endocytosis pathway for productive entry of
1164 hepatitis C virus. *Journal of General Virology* **95**:2658–2667.
- 1165 89. **Hueging K, Doepke M, Vieyres G, Bankwitz D, Frentzen A, Doerrbecker J, Gumz**
1166 **F, Haid S, Wölk B, Kaderali L, Pietschmann T.** 2014. Apolipoprotein E
1167 codetermines tissue tropism of hepatitis C virus and is crucial for viral cell-to-cell
1168 transmission by contributing to a postenvelopment step of assembly. *J Virol* **88**:1433–
1169 1446.
- 1170

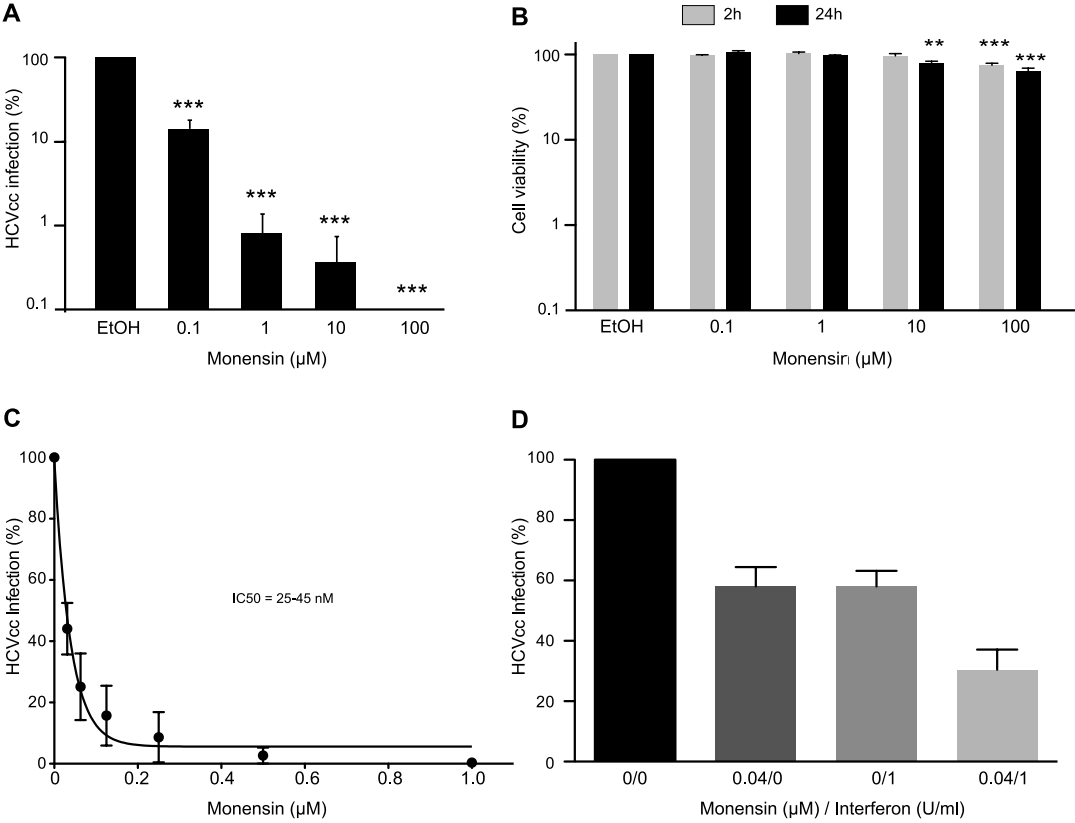


Figure 1

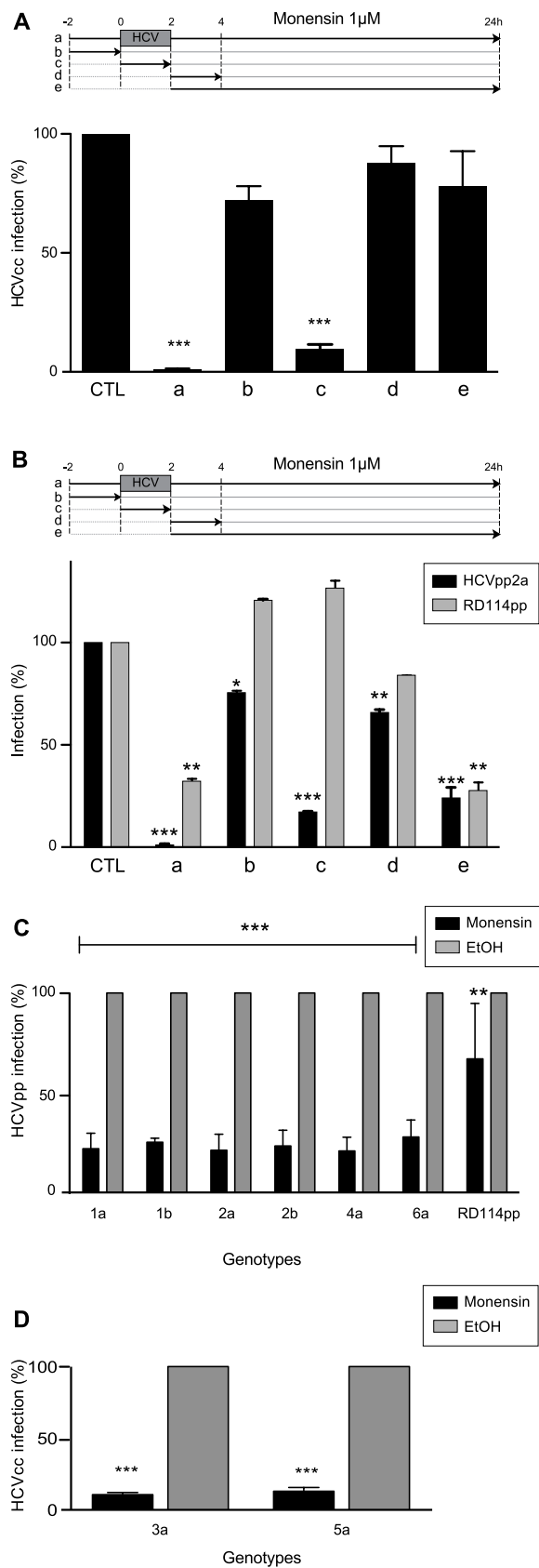


Figure 2

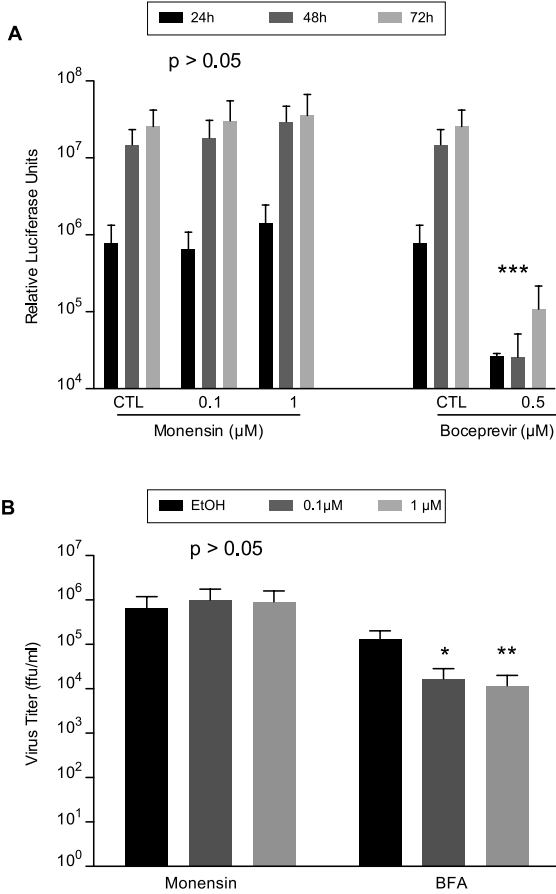


Figure 3

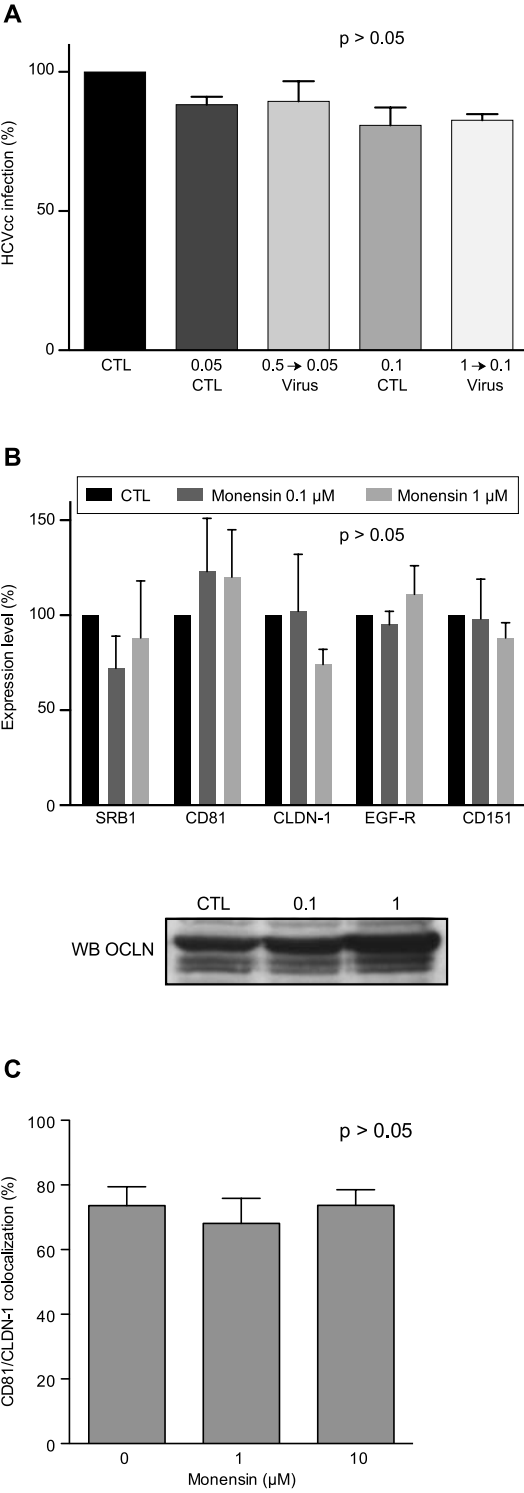


Figure 4

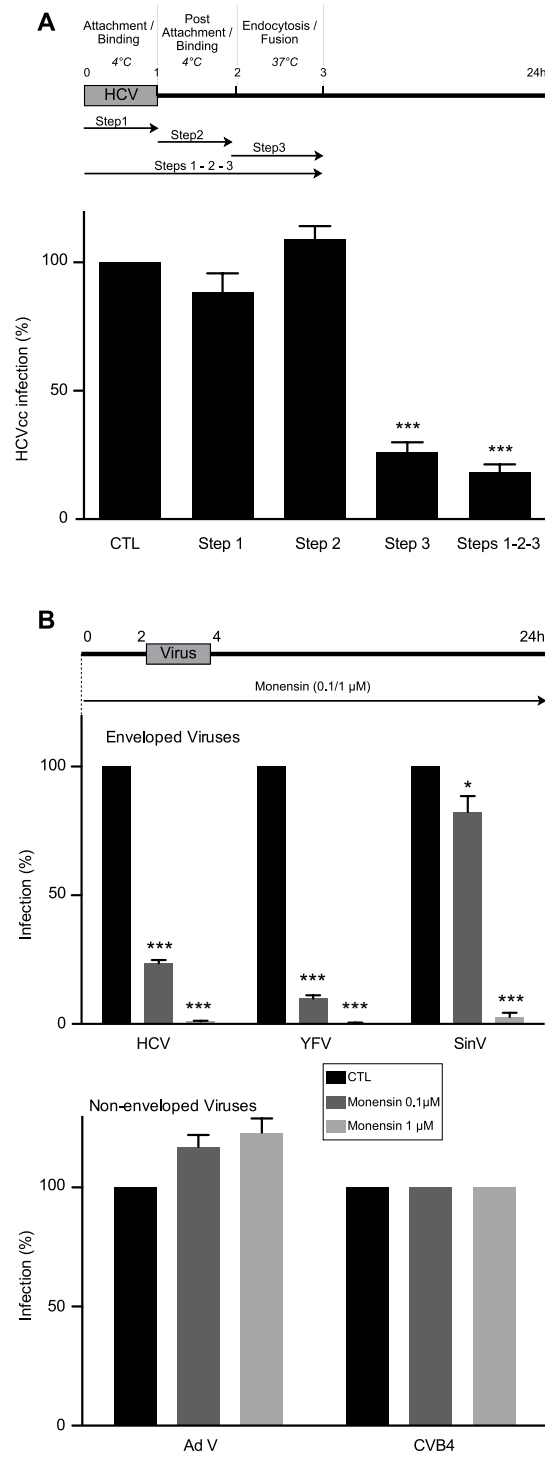


Figure 5

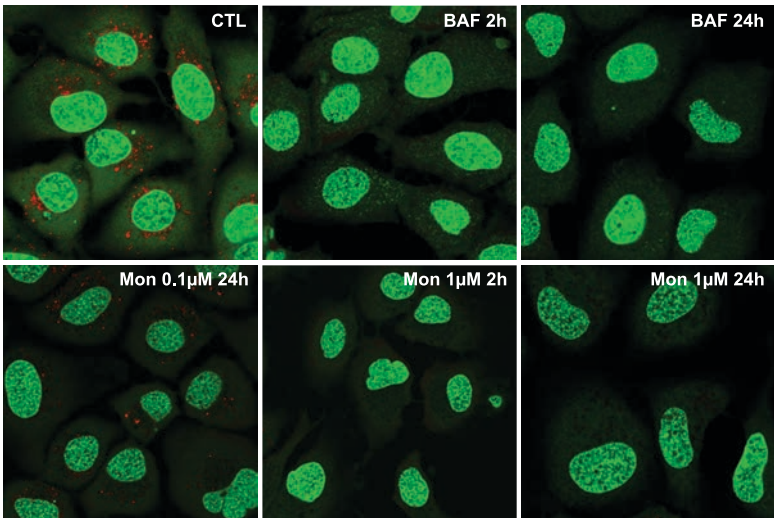


Figure 6

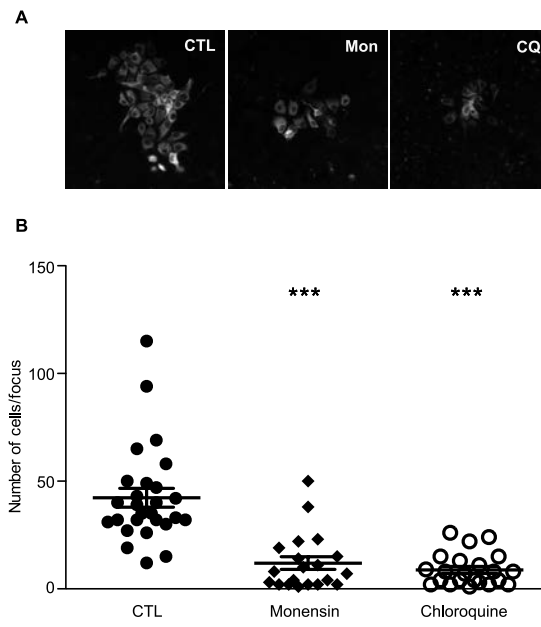


Figure 7

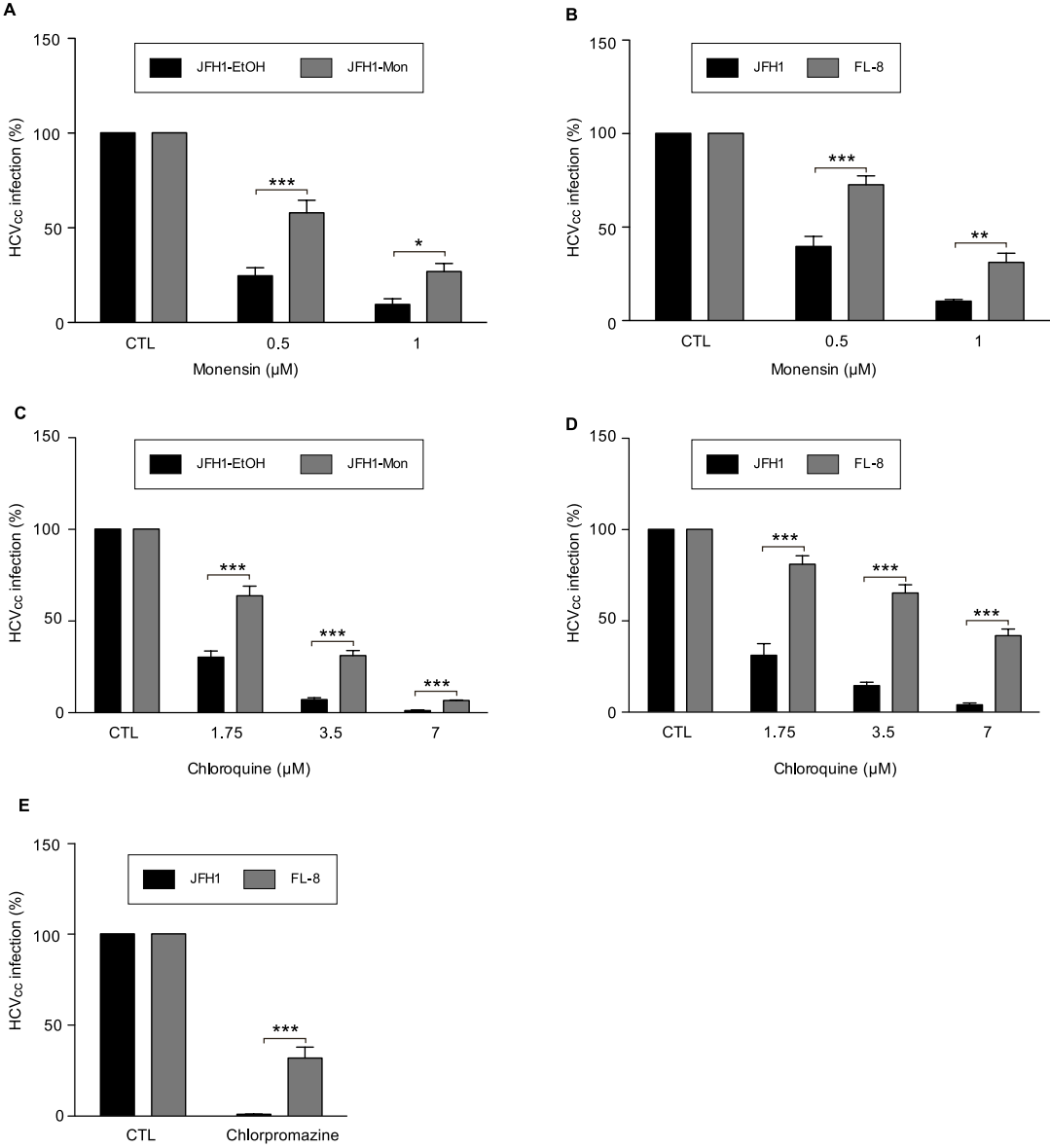
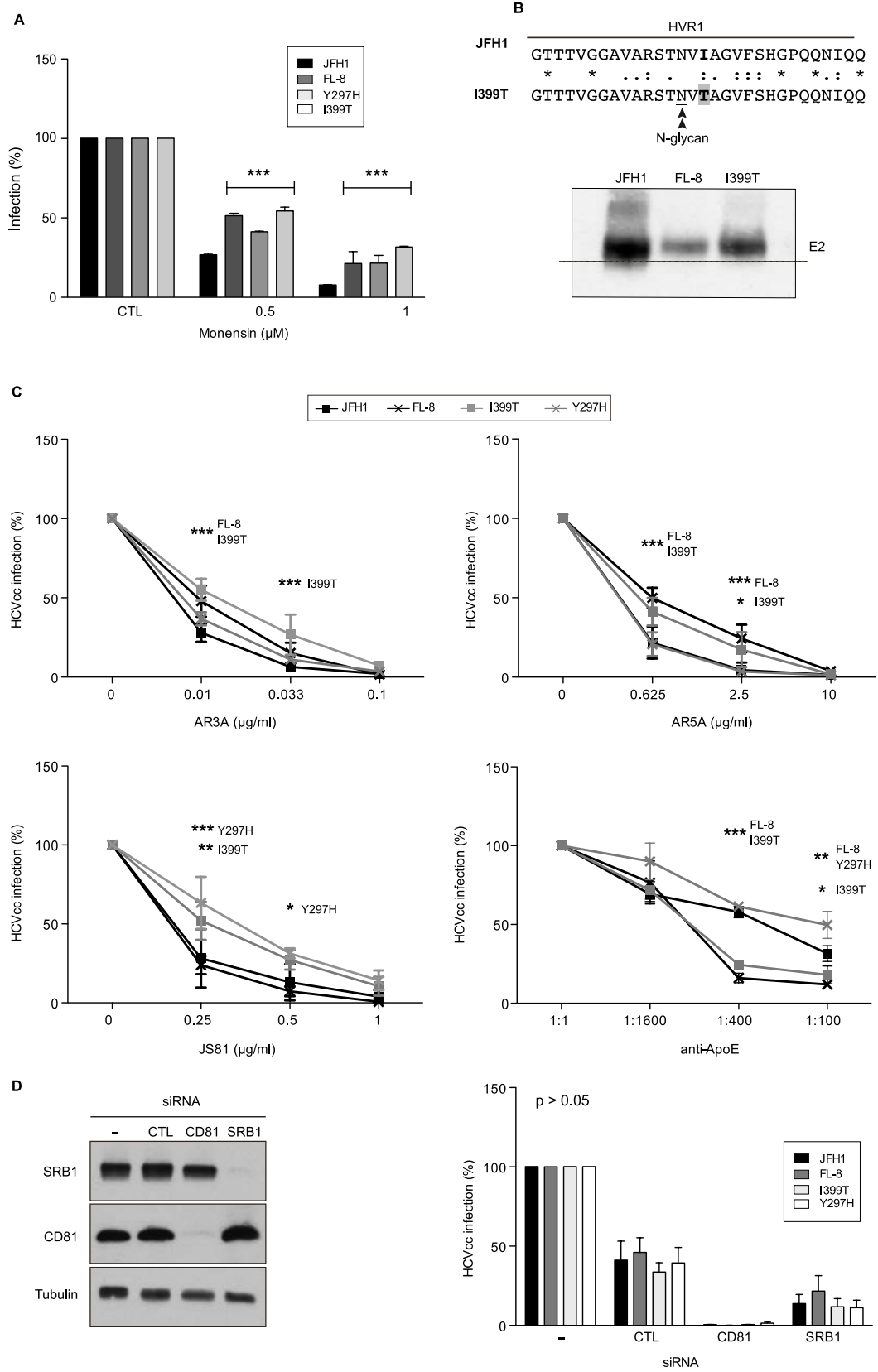


Figure 8



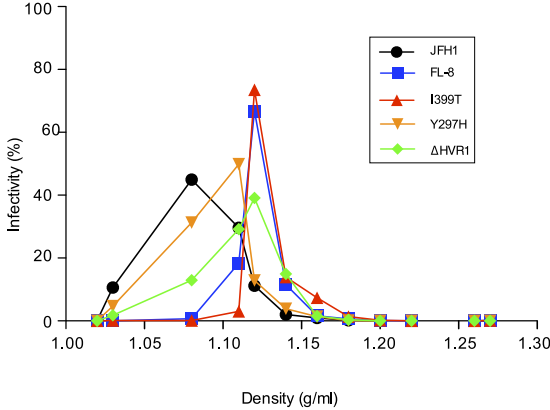


Figure 10

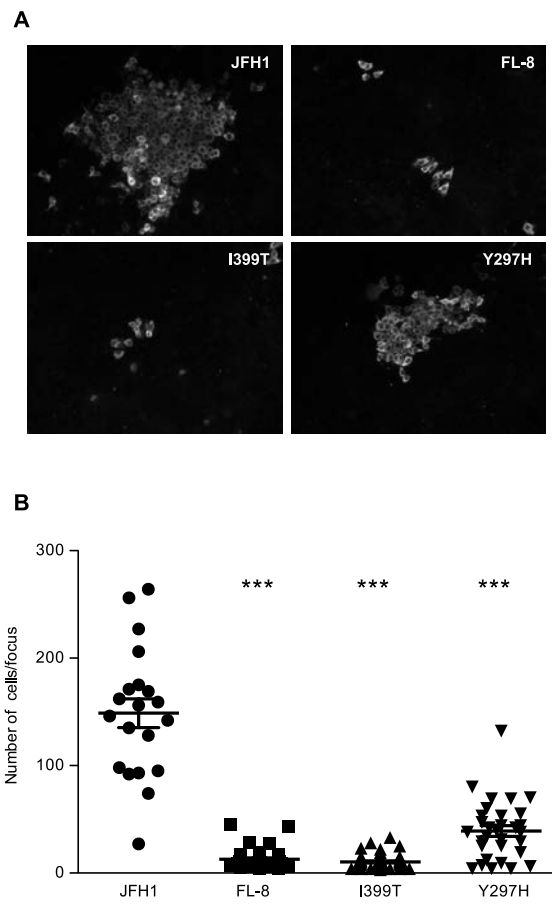


Figure 11

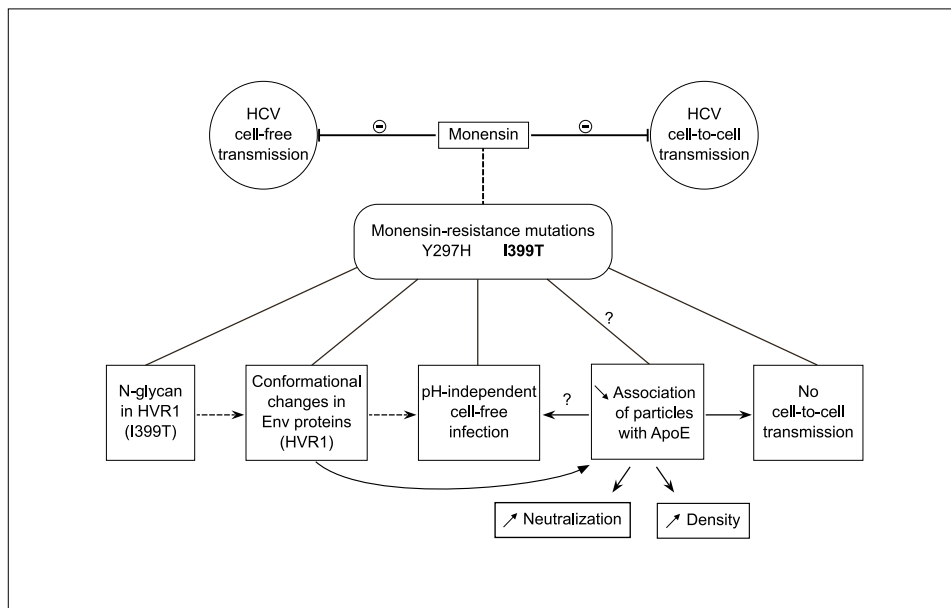


Fig 12

Discussion

Partie 1 :**Identification et analyse fonctionnelle de variants de facteurs d'entrée du Virus de l'Hépatite C (HCV) retrouvés chez des patients très exposés mais non infectés par le HCV**

Les patients UDIV sont particulièrement à risque de contracter non seulement le HIV, mais aussi le HCV. Plus particulièrement, les patients UDIV séropositifs pour le HIV et n'ayant pas été également contaminés par le HCV sont extrêmement rares, suggérant une potentielle résistance naturelle à l'infection par ce virus chez ce groupe de patients.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à de tels patients et nous avons recherché des variants dans les facteurs d'entrée du HCV, qui pourraient expliquer cette résistance. Nous avons identifié deux variants, un dans CLDN-6 (R209Q) et un dans OCLN (P24A), chez un même patient HIV⁺/HCV⁻ et nous en avons fait la caractérisation fonctionnelle.

1- Identification de variants de CLDN-6, OCLN et SR-BI retrouvés chez des patients UDIV HIV⁺/HCV⁻

Le séquençage des gènes codant CLDN-6, -9, OCLN et SR-BI a permis de mettre en évidence cinq variants spécifiquement associés aux patients UDIV HIV⁺/HCV⁻ : un variant faux-sens dans CLDN-6, un variant faux-sens dans OCLN et trois variants dans SR-B1, dont une mutation faux-sens. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces variants pouvaient expliquer la résistance apparente de ces patients. Il est cependant important de souligner que les patients enrôlés dans l'étude n'ont peut-être jamais été exposés au HCV et ne présentent donc en réalité pas de résistance particulière au virus. De plus, dans notre étude, il a été pris le parti de n'enrôler que des patients ayant un historique long d'utilisation de drogues par voie intraveineuse, avant 1995, date à laquelle les programmes de substitution à la méthadone ont commencé. En effet, à partir de cette date, les patients UDIV ont été mieux encadrés et les taux de contamination, bien qu'encore importants, ont considérablement diminué (Wandeler *et al.*, 2012). Cette stratégie nous permettait, *a priori*, d'avoir des patients ayant eu un risque très élevé d'être effectivement exposés au HCV. En revanche, cette stratégie se heurte à un autre problème, qu'est celui des séroréversions. En effet, dès 7 ans après exposition au HCV, des séroréversions sont observées (Rodger *et al.*, 2000; Takaki *et al.*, 2000). Il est donc

tout à fait possible que certains des patients séronégatifs pour le HCV aient en réalité contracté la maladie et en aient guéri spontanément, ce qui penche plus en faveur de facteurs génétiques liés au système immunitaire du patient qu'à une résistance génétique due à des variants dans les facteurs d'entrée du virus. Il aurait été à ce titre intéressant de réaliser un test ELISPOT (*Enzyme-Linked ImmunoSPOT*) sur des PBMCs des patients, afin de voir si les patients de la cohorte avaient été potentiellement exposés au HCV, en réagissant positivement à l'exposition à certains antigènes viraux. Cependant, cette méthode n'est pas complètement fiable, du fait de réactions croisées qui peuvent survenir avec d'autres antigènes viraux, notamment provenant du virus Influenza (Wedemeyer *et al.*, 2001).

Nous avons par la suite réalisé l'étude fonctionnelle des variants de CLDN-6 (R209Q) et OCLN (P24A). Nous n'avons en revanche pas réalisé la caractérisation du variant faux-sens de SR-BI du fait d'une erreur lors de l'analyse de ce variant, qui a été classifié à tort dans la population contrôle. Nous avons généré des constructions lentivirales exprimant soit la forme sauvage ou mutée de CLDN-6, soit la forme sauvage ou mutée d'OCLN fusionnées à la GFP en C-terminal.

2- Les variants R209Q et P24A exprimés seuls n'affectent pas l'entrée du HCV

Afin d'étudier l'effet des variants R209Q et P24A séparément dans un système où la forme sauvage n'est pas présente, nous avons utilisé deux systèmes cellulaires distincts : d'une part les cellules 293T qui deviennent permissives aux HCVpp après expression de CLDN-1, -6 ou -9 (Meertens *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007), et d'autre part les cellules 786-O, qui elles deviennent permissives aux HCVpp après surexpression d'OCLN (Ciesek *et al.*, 2011; Michta *et al.*, 2010; Ploss *et al.*, 2009). Dans ces systèmes, en surexprimant les autres facteurs d'entrée du HCV (OCLN, SR-BI et CD81 dans les cellules 293T et CLDN-1, SR-BI et CD81 dans les cellules 786-O), nous n'avons observé aucun effet des deux variants sur l'entrée des HCVpp. Bien qu'aucun effet n'ait été observé, il était possible que les systèmes utilisés, et en particulier les HCVpp, ne soient pas représentatifs de ce qui se passe chez le patient. De plus, il était tout à fait possible que la co-expression des deux variants soit nécessaire pour impacter l'entrée du HCV. Afin d'écarter cette dernière hypothèse, nous avons utilisé des cellules TZM, qui ont été

décrites pour n'exprimer ni CLDN-1, -6 et -9, ni OCLN, et pour être permissives aux HCVpp lorsque l'on co-exprime l'une de ces CLDNs et OCLN (Ploss *et al.*, 2009). Cependant, lorsque nous avons réalisé ces expériences, les cellules TZMs se sont révélées être permissives aux HCVpp même dans les conditions contrôles, c'est à dire sans transduction de CLDN-6 et d'OCLN. Nous avons vérifié l'expression de CLDN-1 et -6 dans ces cellules, qui ne sont effectivement pas exprimées. En revanche, en absence d'anticorps nous n'avons pas pu vérifier si ces cellules exprimaient CLDN-9. Par ailleurs, nous avons essayé de détecter l'expression d'OCLN dans ces cellules, sans succès, à cause de soucis de marquage avec l'anticorps utilisé. Il est à noter que l'expression hétérologue des formes sauvages ou mutées de CLDN-6 et OCLN dans les cellules TZM a quand même montré une augmentation de la permissivité aux HCVpp. Néanmoins, l'expression hétérologue des variants n'a pas montré de différence dans la permissivité aux HCVpp par rapport aux formes sauvages. Il aurait pu être intéressant d'utiliser un autre modèle cellulaire, telles que les cellules NIH-3T3 d'origine murine, qui deviennent permissives aux HCVpp après expression de CLDN-1, OCLN, CD81 et SR-BI (Ploss *et al.*, 2009). En effet, c'est le modèle cellulaire qui a été utilisé pour identifier OCLN comme facteur d'entrée.

3- Les variants R209Q et P24A co-exprimés dans un système hétérozygote n'affectent pas l'entrée du HCV.

Les deux variants inclus dans notre étude ont été retrouvés chez un patient hétérozygote pour ces deux gènes. Nous avons donc émis l'hypothèse que les variants R209Q et P24A pourraient avoir un effet dominant négatif sur l'infection par le HCV. Pour cela, nous les avons co-exprimés dans des cellules Huh-7. Mais, comme précédemment, aucun effet sur l'infection par le HCV n'a pu être observé. Cependant, il est tout à fait possible que les variants, sans abolir complètement l'entrée du HCV, puissent ralentir la cinétique d'entrée. Or, dans notre premier système, en laissant un temps d'adsorption des particules virales de 2h et en regardant les niveaux d'infection 30h plus tard, il n'était pas possible de voir une modulation subtile de ces mutations sur l'entrée virale. Pour cette raison, nous avons réalisé des expériences, d'une part en diminuant la multiplicité d'infection, et d'autre part en diminuant le temps d'adsorption des particules virales. Nous n'avons cependant vu aucun effet non plus de nos deux

variants dans ces différentes conditions. Par ailleurs, le HCV se transmettant également directement de cellule à cellule et ce de manière dépendante de CLDN-1 et OCLN (Brimacombe *et al.*, 2011; Ciesek *et al.*, 2011; Timpe *et al.*, 2008), nous avons également testé si cette voie d'entrée était affectée par les deux variants. Nous n'avons observé aucun effet non plus sur la transmission cellule-cellule.

Cela n'est cependant pas vraiment surprenant pour plusieurs raisons. En effet, les études réalisées sur CLDN-1 ont montré que la région de la protéine impliquée dans l'infection était la boucle ECL1, qui interagit avec la LEL de CD81 (Cukierman *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2012; Harris *et al.*, 2010). Il a également été montré très récemment que la particule virale interagissait, via les complexes E1E2, avec le domaine ECL1 de CLDN-1 (Douam *et al.*, 2014). De plus, des mutations dans la queue C-terminale de CLDN-1 ou sa délétion, n'ont montré aucun effet sur l'entrée du HCV (Cukierman *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2007). Or, la mutation R209Q se trouve dans la queue C-terminale de CLDN-6.

De la même façon, il a été montré que c'était le domaine ECL2 d'OCLN qui était important pour l'entrée virale (Ciesek *et al.*, 2011). Il semblerait également que certaines régions de ECL1 soient impliquées (Michta *et al.*, 2010; Sourisseau *et al.*, 2013). Il a aussi été suggéré que certains résidus sérine de la queue cytosolique C-terminale pouvaient être phosphorylés via l'induction de l'expression de VEGF par le HCV, et ainsi promouvoir l'entrée du virus en relocalisant l'OCLN en dehors des jonctions serrées (Mee *et al.*, 2010). En revanche, rien n'a été décrit concernant la queue cytosolique N-terminale, dont la fonction est d'ailleurs encore méconnue, alors que dans notre cas, la mutation P24A se situe dans cette queue N-terminale.

4- Les variants R209Q et P24A n'affectent pas l'infection par le HCV dans des cellules polarisées

Bien que nous n'ayons vu aucun effet des deux variants dans les différents modèles cellulaires utilisés précédemment, il était malgré tout important de tester nos variants dans des modèles de cellules polarisées. En effet, CLDN-6 et OCLN sont deux protéines de TJs. De plus, il a été largement démontré dans la littérature, que la polarisation des cellules hépatocytaires était un frein à l'infection et que les pools de CLDNs et OCLN utilisés par le virus se situaient en dehors des TJs (Mee *et al.*, 2008;

2009; Reynolds *et al.*, 2008). Or, les mutations retrouvées dans CLDN-6 et OCLN pourraient avoir un impact sur la localisation de ces protéines au sein des TJs et donc impacter la perméabilité des cellules à l'infection. Pour cela nous avons utilisé deux modèles différents. Tout d'abord, nous avons utilisé un modèle de cellules HepG2-CD81 capables de se polariser en formant des monocouches sur des transwells, délimitant ainsi un compartiment apical et un compartiment basolatéral (Belouzard *et al.*, données non publiées). Ensuite, afin de nous rapprocher au mieux des conditions physiologiques, nous avons utilisé des PHHs. Cependant, dans aucun de ces deux modèles nous n'avons pu voir d'effet particulier de nos variants sur l'infection.

Il semblerait donc que la mutation R209Q, située dans le domaine PDZ de CLDN-6, par homologie avec ce qui est observé pour les autres CLDNs, n'affecte pas son interaction avec les protéines ZO (Itoh *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2002; Turksen & Troy, 2001). De plus, une étude réalisée sur CLDN-5 a montré que les déterminants des interactions entre les différentes CLDNs au sein d'une même cellule et entre deux cellules adjacentes passaient par le domaine ECL2 (Piontek *et al.*, 2008).

Concernant OCLN la question est plus complexe. En effet, du fait de l'absence d'anticorps de surface permettant de détecter OCLN, nous avons dû fusionner la protéine à un tag fluorescent, dans notre cas la GFP. La mutation se trouvant à l'extrémité N-terminale de la protéine, et afin de ne pas modifier un potentiel effet de la mutation à cause du tag, nous avons fusionné la GFP en C-terminal. Or, une étude a montré que de telles constructions avec des CLDNs ne permettaient plus la colocalisation avec ZO-1 (Sasaki *et al.*, 2003). En effet, le domaine C-terminal d'OCLN est impliqué dans l'interaction avec ZO-1 (Furuse *et al.*, 1994; Raleigh *et al.*, 2011; Sakakibara *et al.*, 1997). De plus, OCLN, bien que participant au bon fonctionnement des TJs, n'est pas essentielle à leur formation, qui est toujours initiée par les CLDNs (Furuse *et al.*, 1998). Il est donc possible que les cellules se polarisent malgré l'absence de recrutement d'OCLN aux TJs dans nos modèles. De plus, la région C-terminale est impliquée dans la dimérisation des molécules d'OCLN au sein des TJs, l'ajout du tag pourrait affecter également cette dimérisation et affecter sa localisation aux TJs (Blasig *et al.*, 2006). Il a par ailleurs été montré que des mutants d'OCLN délétés de leur domaine N-terminal affectent l'intégrité des TJs (Bamforth *et al.*, 1999). Cependant, les observations en microscopie à immunofluorescence n'ont pas pas montré de

mislocalisation de cette protéine dans les cellules polarisées ; ce qui suggère que nos constructions sont fonctionnelles.

5- Les variants R209Q et P24A n'exercent pas une restriction sur l'entrée du HCV de manière dépendante du génotype.

Des études récentes ont montré que les protéines CLDNs et OCLN étaient utilisées différemment suivant les génotypes viraux considérés. En effet, une étude a montré que les isolats de génotypes 2a utilisaient moins bien CLDN-6 que les autres génotypes testés dans cette étude (Haid *et al.*, 2014). Cependant, une étude plus ancienne utilisant des HCVpp des différents génotypes n'avait pas observé une telle différence. En effet, les différences observées étaient similaires suivant les différentes CLDNs exprimées dans des cellules 293T (Meertens *et al.*, 2008). De façon similaire, une étude a montré que les génotypes 1a et 3a étaient plus sensibles à la neutralisation par des anticorps anti-Flag utilisés contre des protéines OCLN taguées (Sourisseau *et al.*, 2013). Dans notre étude nous avons utilisé majoritairement les génotypes 1a et 2a. Suite à la publication de Sourisseau et collaborateurs, nous avons testé également le génotype 3a à l'aide d'une chimère 3a/2a. Cependant, nous n'avons vu aucun effet de nos constructions sur le génotype 3a. Suite au reviewing de l'article, nous avons testé l'ensemble des génotypes que nous avons à disposition au laboratoire : 1a, 2a, 2b, 3a, 4a, 5a et 6a. Aucun de ces génotypes n'a vu son infectiosité impactée par nos deux variants.

Bien que l'ensemble de cette étude fonctionnelle n'ait montré aucun effet de nos deux variants dans l'infection par le HCV, il ne peut être exclu que ces derniers aient un impact significatif dans d'autres types cellulaires, autre que les lignées hépatocytaires. En effet, CLDN-6 n'est que faiblement exprimée au niveau des hépatocytes. Il a à ce titre été suggéré par Haid et collaborateurs, que CLDN-6, dans ces cellules, ne serait que peu utilisée, les particules virales utilisant préférentiellement CLDN-1 (Haid *et al.*, 2014). Il est donc possible que dans nos modèles, où les formes mutées et sauvages de CLDN-6 sont co-exprimées avec CLDN-1, qu'un effet délétère sur l'infection ne puisse être observé. De plus, il a été montré que CLDN-6 était exprimée dans les lymphocytes T (Sarhan *et al.*, 2012). Or des études ont montré que ces cellules pouvaient être

permissives au HCV et constituer un réservoir. Il est donc envisageable que nos variants jouent un rôle ailleurs que dans les hépatocytes.

En conclusion, la caractérisation fonctionnelle des variants R209Q et P24A n'a pas montré d'effet de ces deux mutations dans l'entrée du HCV, et ce dans de nombreux modèles cellulaires. Il serait cependant intéressant de réaliser l'étude fonctionnelle du variant faux-sens retrouvé dans SR-BI.

Partie 2 :

Rôle de la tétraspanine CD151 dans le cycle infectieux du HCV

CD81 est une protéine de la famille des tétraspanines, dont le rôle dans l'infection par le HCV a été longuement documenté. Plus récemment, l'importance de la dynamique membranaire de CD81 et l'implication potentielle des tétraspanines CD63 et CD151, nous a conduit à étudier l'implication des tétraspanines hépatocytaires dans l'infection par le HCV. En effet, que ce soit par leur capacité à réguler la dynamique membranaire via l'organisation du *tetraspanin web*, ou par leur capacité à réguler l'activité des protéines avec lesquelles elles interagissent, dont des facteurs d'entrée du HCV, elles représentent des cibles intéressantes à étudier.

Ainsi, nous avons étudié l'implication dans l'infection par le HCV des tétraspanines CD151, CD63, CD82, CD9 et Tspan8. Nous avons mis en évidence que CD151 était importante pour l'infection par le HCV, probablement par un rôle indirect en empêchant la clusterisation de CD81.

1- CD151 est impliquée dans l'infection par le HCV

Afin de tester si les différentes tétraspanines de notre étude avait un impact sur l'infection par le HCV, nous avons réalisé un test de neutralisation de l'infection, en utilisant des anticorps ciblant les différentes tétraspanines. Nous avons alors mis en évidence que CD151 et CD63 étaient impliquées dans l'infection par le HCV. Cependant, la neutralisation de l'infection étant modérée et n'étant obtenue qu'à une concentration de 30 µg/ml, il est probable que le rôle de ces tétraspanines dans l'infection soit secondaire, comparé à CD81. En effet, dans les mêmes conditions, l'infection était neutralisée de façon importante par un anticorps ciblant CD81 à 5 µg/ml.

Nous avons également inclus dans ce test de neutralisation, l'intégrine β1. En effet, l'intégrine β1 est non seulement une protéine partenaire de plusieurs tétraspanines (Cailleateau *et al.*, 2010; Serru *et al.*, 1999; Yauch *et al.*, 1998a) et en particulier de CD151 (Yauch *et al.*, 1998a), mais en plus, une étude récente a montré que cette intégrine était impliquée dans l'entrée du HCV (Zona *et al.*, 2013). Dans cette étude, les auteurs ont montré, par des expériences de silencing et en utilisant un anticorps spécifique, que l'intégrine β1 était impliquée dans l'entrée. Dans cette étude, les auteurs

ont également montré l'importance de la protéine de liaison au GTP Rap2B et de la GTPase HRas dans l'entrée virale (Zona *et al.*, 2013). Les auteurs ont alors suggéré que l'ensemble de ces protéines pouvait former une plateforme, qui pourrait jouer un rôle dans les voies de signalisation importantes pour HCV (Liu *et al.*, 2012; Lupberger *et al.*, 2011; Zona *et al.*, 2013). Il a été notamment suggéré que l'intégrine $\beta 1$ pouvait jouer un rôle en régulant l'activité de l'EGF-R (Morello *et al.*, 2011). Il serait alors possible que certaines tétraspanines, notamment CD151, puisse réguler l'activité et la localisation de cette intégrine. Il a en effet été montré que CD151 favorisait l'association de l'intégrine $\beta 1$ avec des GTPase membranaires, et plus particulièrement en recrutant des protéines Ras (Hong *et al.*, 2012). Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas observé d'effet de l'anticorps anti- $\beta 1$ sur l'infection par le HCV. Il est possible que dans notre système cellulaire, une autre intégrine, par exemple l'intégrine $\alpha 6$, puisse avoir un rôle redondant dans l'entrée du HCV. En effet, il a également été montré que CD151 pouvait réguler la voie de signalisation de l'EGF-R via l'intégrine $\alpha 6$ (Yang *et al.*, 2008b). Par contre, il est également possible que seul le pool de CD151 non associé aux intégrines soit impliqué dans l'entrée du HCV. Il serait alors intéressant d'utiliser l'anticorps TS151r, qui reconnaît uniquement le pool de CD151 non associé aux intégrines.

Parallèlement, nous avons utilisé en contrôle des PsV HPV16 sur des cellules 293TT. En effet, le HPV utilise les TEMs pour pénétrer dans ses cellules cibles et est neutralisé par des anticorps anti-CD151 et anti-CD63 (Spoden *et al.*, 2007). Nous avons observé avec ce modèle, que nous inhibions l'infection par les PsV HPV16 uniquement avec les anticorps ciblant CD151. Cependant, dans la littérature, il a été montré que suivant les types cellulaires, le HPV était plus ou moins sensible à la neutralisation par les anticorps anti-CD151 et anti-CD63. Ainsi, dans des cellules HeLa, aucune inhibition n'a été observée avec l'anticorps anti-CD63, alors qu'une inhibition de 40% était observée dans des cellules 293TT (Spoden *et al.*, 2007). Bien que nous ayons utilisé les mêmes cellules, nous ne pouvons pas exclure que les conditions de culture, notamment des différences de sérum utilisé, puissent avoir impacté l'effet des anticorps anti-CD63 sur l'infection.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé des expériences de silencing. Ces expériences ont permis de confirmer une implication de CD151 dans le cycle viral. De plus, cet effet semble bien être spécifique, puisque le silencing de CD151 n'affecte pas l'expression de CD81. En revanche, nous n'avons pas confirmé l'implication de CD63,

contrairement à ce qui est décrit dans la littérature (Park *et al.*, 2013). Cependant, les niveaux de silencing que nous obtenions étaient d'environ 60% pour CD63. Ceci est d'ailleurs en accord avec ce que nous avons observé avec les PsV HPV16. En effet, les niveaux de silencing trop faibles obtenus dans les 293TT, ne nous ont pas permis de voir d'effet du silencing de CD151 et de CD63 sur l'infection. Une explication alternative à l'absence d'effet du silencing de CD63 sur l'infection par les HCVcc, pourrait être les cellules utilisées. En effet, la seule différence entre cette étude et la nôtre, en dehors potentiellement des niveaux de silencing, est la lignée cellulaire utilisée pour les infections. En effet, dans notre étude nous avons utilisé les cellules Huh-7 alors que dans l'étude de Park et collaborateurs, des cellules Huh-7.5.1 ont été utilisées. Il est possible, comme cela a été observé avec le HPV, que l'utilisation de certaines tétraspanines pour l'infection, et plus particulièrement de CD63, soit dépendante du type cellulaire (Spoden *et al.*, 2007).

2- CD151 n'interagit pas directement avec les particules virales

Etant donné que nos premiers résultats ont montré que CD151 était impliquée dans l'infection virale, nous avons voulu voir si une interaction directe entre la particule virale et la LEL de CD151 pouvait affecter l'entrée du HCV. Dans nos conditions, nous n'avons pas vu d'inhibition de l'infection par le HCV. Ceci suggère donc qu'*a priori*, une interaction directe de la LEL de CD151 avec la particule virale n'est pas nécessaire à sa fonctionnalité. Cependant, ceci n'exclut pas totalement une interaction entre la particule virale et CD151. En effet, il est possible que l'interaction entre la particule virale et CD151 ait lieu plus tardivement au cours de l'entrée. Il est aussi possible que des changements de conformation des glycoprotéines d'enveloppe soient nécessaires afin de permettre cette interaction. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser un test d'internalisation des particules virales dans des cellules dans lesquelles un silencing de CD151 a été réalisé. De plus, il est également possible que la LEL de CD151 interagisse avec la particule virale, mais que cette interaction n'ait aucun impact sur l'infection. Ceci est d'autant moins à exclure que pour le moment, nous n'avons pas encore formellement démontré que l'effet du silencing de CD151 sur le cycle de réplication viral avait bien lieu à l'étape d'entrée. Bien que nous ayons observé une neutralisation de l'infection en utilisant un anticorps anti-CD151, cet effet n'était observé qu'à une forte concentration d'anticorps. Il serait nécessaire par la suite de

réaliser des tests de neutralisation et d'infection avec des HCVpp, qui permettent d'analyser uniquement l'étape d'entrée du HCV. Néanmoins, il est possible que, comme cela a été montré pour le PRRSV, un virus infectant le porc, CD151 soit capable de promouvoir la réplication virale en s'associant avec l'ARN du HCV (Shanmukhappa *et al.*, 2007). Cette hypothèse pourra être testée en analysant l'effet du silencing de CD151 dans un système de réplicon subgénomique du HCV.

Par ailleurs, contrairement à ce qui a été observé par Park et collaborateurs, nous n'avons pas vu d'inhibition de l'infection suite à la préincubation des particules virales avec la LEL de CD63. Park et collaborateurs avait alors avancé l'hypothèse d'un rôle direct de CD63 du fait de son interaction avec la forme soluble de E2. Toutefois, il a été observé à plusieurs reprises que la forme soluble de E2 ne reflétait pas toujours les interactions réelles entre la protéine E2 native et d'autres protéines (Douam *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2007; Flint *et al.*, 2006). De plus, Park et collaborateurs ont réalisé une incubation de 2h à 4°C avec les particules virales, alors que, dans notre cas, cette incubation est de 1h à 37°C. Ceci implique dans nos conditions, une interaction plus spécifique entre la LEL de CD63 et la particule virale, pour voir un effet sur l'infection par le HCV. Il est donc possible que l'effet observé par Park et collaborateurs avec la LEL ne soit pas un effet spécifique. Ceci corrèle d'ailleurs avec les niveaux d'inhibition qu'ils obtiennent avec la LEL de CD81, de l'ordre de 90%, à comparer avec les 60% d'inhibition que nous obtenons dans nos conditions. Dans de telles conditions, il n'est pas surprenant que nous ne voyions pas d'effet de la LEL de CD63, quand Park et collaborateurs voient une inhibition de l'ordre de 60%.

Enfin, la surexpression des différentes tétraspanines n'a pas montré d'effet sur l'infection par le HCV. L'absence d'effet de la surexpression de CD151 et CD63 est peut-être dûe à un effet seuil. En effet, par exemple, il a déjà été montré que la surexpression de CD81 n'entraînait pas d'augmentation de l'infection (Koutsoudakis *et al.*, 2006). Cela est aussi comparable à ce qui a été observé dans des cellules 293T, où d'autres facteurs d'entrée sont limitants et où leur surexpression concomitante, permet d'augmenter l'infection dans ces cellules (Da Costa *et al.*, 2012).

3- CD151 empêche la clusterisation de CD81

Sur base de nos résultats, nous avons émis l'hypothèse que CD151 avait un rôle indirect dans l'entrée virale. Les différents travaux réalisés dans le laboratoire ont

montré que l'entrée du HCV était modulée par la dynamique membranaire de CD81. Il a ainsi été démontré qu'EWI-2wint, entraînait le confinement de CD81 dans des zones enrichies en CD81, où sa mobilité est réduite. En effet, l'association entre CD81 et EWI-2wint, induit un recrutement de CD81 au niveau de zones enrichies en CD81. Ainsi, le jeu d'interaction de CD81 avec ses partenaires influence sa répartition membranaire, sa clusterisation, ce qui a un impact direct sur sa diffusion membranaire, essentielle à une infection productive par le HCV (Potel *et al.*, 2013). Ceci est en accord avec une autre étude, qui a démontré l'importance de la mobilité membranaire de CD81 dans l'infection par le HCV (Harris *et al.*, 2013). CD151 étant une protéine du *tetraspanin web*, il est possible que celle-ci régule l'interaction de CD81 avec ses protéines partenaires et d'autres tétraspanines, et ainsi, influence son association avec les régions enrichies en CD81, modulant ainsi l'infection. Nous avons testé cette hypothèse en utilisant des cellules Huh-7w7/mCD81 et les anticorps MT81w et MT81, reconnaissant respectivement le CD81 murin sous forme clusterisée ou l'ensemble des molécules de CD81 membranaires (Potel *et al.*, 2013; Rocha-Perugini *et al.*, 2009). Des expériences de silencing et de surexpression de CD151 dans les cellules Huh-7w7/mCD81 ont montré que CD151 modulait la clusterisation de CD81. En effet, nous avons observé dans les cellules n'exprimant plus CD151, une augmentation du ratio MT81w/MT81, indiquant une clusterisation accrue de CD81 en l'absence de CD151. A l'inverse, dans les cellules surexprimant CD151, le ratio diminuait, indiquant une clusterisation moindre de CD81 en présence d'un excès de molécules de CD151. Il semble donc que CD151, par son rôle d'organisateur moléculaire au niveau de la membrane plasmique, puisse réguler l'entrée du HCV. Cependant, pour le moment, nous ne savons pas si cet effet est spécifique. Pour cela, nous réaliserons les mêmes expériences avec une autre tétraspanine, par exemple Tspan8, qui n'a pas montré d'effet sur l'infection par le HCV.

4- Perspectives

Dans l'état actuel de ce travail, il reste difficile de spéculer sur le mécanisme par lequel CD151 promeut l'infection par le HCV. Si nos résultats préliminaires semblent aller dans le sens d'une régulation de la dynamique membranaire de CD81, nous ne savons pas par quel jeu d'interactions cette dynamique est modulée. Afin de mieux comprendre ce mécanisme, nous envisageons de réaliser des expériences de silencing,

suivie d'une restauration de l'expression de mutants de CD151. En effet, nous disposons de plusieurs mutants qui nous ont été fournis par F. Berditchevski (Birmingham, Royaume-Uni). Un premier mutant, CD151_{PALM}, nous permettra tout d'abord d'étudier l'importance de la palmitoylation de CD151 dans l'infection par le HCV et donc des interactions tétraspanine-tétraspanine (Charrin *et al.*, 2002). Egalement, un autre mutant, CD151_{YALA}, nous permettra de voir si l'internalisation par endocytose dépendante de la clathrine de CD151 est importante pour l'entrée du HCV, comme cela a été observé avec le HPV (Scheffer *et al.*, 2013). Enfin, nous disposons de mutants nous permettant d'étudier l'importance de l'association de CD151 aux intégrines, même si nos résultats préliminaires avec l'intégrine $\beta 1$ n'ont pas donné de résultats concluants. Pour cela, nous utiliserons les mutants CD151_{GLY}, CD151_{QRD} et CD151 Δ C, qui abolissent la fonctionnalité de CD151 dépendante des intégrines, en particulier $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ (Baldwin *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007).

Pour mieux étudier l'importance des intégrines dans l'entrée du HCV, il serait intéressant de réaliser des expériences de silencing, où l'expression de CD151 serait inhibée ainsi que celle d'une ou plusieurs intégrines en même temps. En effet, cela éviterait d'avoir des phénomènes de redondance, qui masqueraient l'importance de ces protéines dans le cycle de réplication viral.

Par ailleurs, si nous confirmons la spécificité de l'effet de CD151 sur la clusterisation de CD81, il sera important de réaliser des expériences de SMT en microscopie TIRF. Ceci permettrait d'avoir une idée plus précise de l'effet de CD151, non seulement sur la dynamique de CD81, mais aussi sur d'autres facteurs d'entrée telles que CLDN-1 ou OCLN.

Partie 3 :

Nouveaux éléments dans la compréhension de l'entrée et de la transmission cellule-cellule du Virus de l'Hépatite C grâce à l'utilisation de la Monensine A

La Monensine A est un ionophore polyéther capable d'interférer avec le cycle de réplication de nombreux pathogènes. Il a ainsi été décrit que la Monensine inhibait l'étape d'entrée de certains virus, notamment en bloquant l'étape de fusion dépendante du pH, comme c'est le cas par exemple avec le SFV (Marsh *et al.*, 1982), le virus de la maladie de Newcastle (Sánchez-Felipe *et al.*, 2014), ou encore le Chikungunya (Nuckols *et al.*, 2014).

Dans notre étude, nous avons montré que la Monensine inhibait l'étape de fusion du HCV ainsi que la transmission cellule-cellule. Par ailleurs, des mutants de résistance à la Monensine ont été générés : la mutation Y297H dans E1 et la mutation I399T, qui introduit un site de N-glycosylation dans la région HVR1 de E2. Ces mutations dans les glycoprotéines d'enveloppe du HCV conduisent à un certain nombre de caractéristiques particulières. En effet, ces mutations permettent au virus d'être moins dépendant du pH acide des endosomes pour son entrée, induisent vraisemblablement des changements conformationnels dans les protéines d'enveloppe, entraînent la production de particules virales plus denses et empêchent la transmission des particules de cellule à cellule.

1- La Monensine inhibe une étape tardive de l'entrée du HCV

Nous avons montré que la Monensine inhibait l'infection par le HCV de manière dose-dépendante, et ce à des concentrations n'induisant pas de toxicité cellulaire. Nous avons alors testé l'effet de la combinaison entre la Monensine et l'IFN- α sur l'infection par le HCV, qui s'est révélé être un effet additif. Cependant, la Monensine présente une forte toxicité chez l'Homme, contrairement à ce qui est observé chez certains animaux comme les bovins ou les volailles, causant notamment des rhabdomyolyses (Caldeira *et al.*, 2001; Kouyoumdjian *et al.*, 2001; Novilla *et al.*, 1994). Cette forte toxicité n'en fait pas une molécule candidate pour un usage antiviral. Cependant, certains dérivés de Monensine, comme la Monensine méthyl-éther, seraient de bons candidats. En effet, ils présentent une moindre toxicité *in vivo* chez la souris et sur des cellules primaires

humaines, tout en conservant une bonne activité, bien que moindre, contre le *Plasmodium* (Gumila *et al.*, 1996; 1997).

Afin de déterminer l'étape du cycle de réplication virale inhibée par la Monensine, nous avons réalisé des expériences de cinétique. Ces expériences ont montré que la Monensine inhibait l'entrée des HCVcc. Ces résultats ont été confirmés en utilisant des HCVpp, qui permettent d'étudier uniquement l'étape d'entrée (Bartosch *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003). Nous avons utilisé des HCVpp pseudotypés par les glycoprotéines d'enveloppe de différents génotypes du HCV : 1a, 2a, 2b, 4a et 6a. L'ensemble de ces génotypes était inhibé, avec la même amplitude, par la Monensine. Afin de tester l'effet de la Monensine sur les génotypes 3a et 5a, que nous n'avons pas réussi à produire en HCVpp, nous avons utilisé des chimères intergénomiques basées sur le JFH1. Ces génotypes étaient également affectés par la Monensine.

Afin de mieux comprendre le mécanisme par lequel la Monensine inhibe l'infection, nous avons dans un premier temps déterminé si la Monensine agissait au niveau de la cellule ou directement au niveau de la particule virale. En effet, comme cela a été montré pour l'Epigallocatechine-3-gallate (EGCG), la particule virale peut directement être affectée par une molécule antivirale et ainsi bloquer son entrée dans les cellules cibles (Calland *et al.*, 2012). Dans notre cas, la Monensine n'avait pas d'effet sur la particule virale. Nous avons alors analysé si la Monensine affectait l'expression et la localisation de certains des facteurs d'entrée du HCV. Ainsi, la Monensine n'affectait ni l'expression en surface de CD81, SR-BI et CLDN-1, ni l'expression cellulaire d'OCLN. Nous avons également observé que la Monensine n'affectait pas la colocalisation de CD81 et CLDN-1, suggérant donc que la formation de ces complexes n'était probablement pas affectée par la Monensine. En effet, les complexes CD81/CLDN-1 sont essentiels à l'entrée virale (Davis *et al.*, 2012; Harris, 2008; Mee *et al.*, 2009). Ce résultat est d'autant plus intéressant que récemment, une étude a montré que la Monensine affectait le trafic et l'activation de l'EGF-R (Dayekh *et al.*, 2014). Or, il a été montré que l'activation de l'EGF-R participait non seulement à la formation des complexes CD81/CLDN-1, mais également à l'internalisation de la particule virale (Diao *et al.*, 2012; Lupberger *et al.*, 2011). De plus, l'utilisation d'Erlotinib, une molécule qui inhibe l'activité tyrosine kinase de l'EGF-R inhibe également l'entrée du HCV (Lupberger *et al.*, 2011). Il apparaît donc, que dans le cas du HCV, l'inhibition de l'infection ne passe pas par ce mécanisme potentiel d'action de la Monensine.

Si les premiers résultats suggéraient un rôle dans l'entrée, nous ne pouvions pas exclure que la Monensine puisse également affecter, même dans une moindre mesure, d'autres étapes du cycle infectieux du HCV. Nous avons montré, en utilisant comme contrôle le Bocéprévir, un inhibiteur de la protéase NS3 (Poordad *et al.*, 2011), que la Monensine n'affectait pas la réplication du HCV. Egalement, nous avons montré que la Monensine, contrairement à la bréfeldine A (BFA) (Farhat *et al.*, 2013; Goueslain *et al.*, 2009), n'affectait pas l'assemblage et la sécrétion des particules virales. Il aurait cependant été possible que la Monensine affecte des étapes tardives du cycle viral. En effet, en augmentant le pH des compartiments intracellulaires, et notamment celui du Golgi (Tartakoff, 1983), la Monensine peut affecter la maturation post-traductionnelle de certaines protéines virales, comme cela a été montré, par exemple, dans le cas du HIV ou du VSV (Alonso & Compans, 1980; Dewar *et al.*, 1989).

2- La Monensine inhibe l'étape de fusion du HCV

La Monensine ayant un effet spécifique sur l'entrée du HCV, nous avons cherché à déterminer quelle étape de l'entrée était affectée par la Monensine. En effet, l'entrée du HCV est une étape complexe et multiséquentielle. Elle débute par une étape d'attachement à des facteurs cellulaires non spécifiques, qui permet à la particule virale d'entrer en contact avec ses facteurs d'entrée spécifiques, que sont SR-BI, CD81, CLDN-1, ou encore OCLN. Ces interactions aboutissent à la formation d'un complexe entre la particule virale et certains de ces facteurs, qui est internalisé par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Blanchard *et al.*, 2006). L'enveloppe virale fusionne alors avec la membrane d'un endosome précoce, de manière dépendante du pH, permettant ainsi de relarguer le génome viral dans le cytoplasme (Haid *et al.*, 2009). Des études de cinétique ont montré qu'une étape tardive de l'entrée était affectée par la Monensine.

Afin d'étudier l'effet de la Monensine sur la voie d'endocytose dépendante de la clathrine, nous avons utilisé deux virus contrôle, l'AdV5 et le CBV4, deux virus non enveloppés, qui semblent utiliser cette voie d'entrée (Suomalainen *et al.*, 2013). De manière intéressante, la Monensine n'inhibait pas l'infection par ces virus, suggérant ainsi que la Monensine n'affecte pas cette voie d'internalisation. Ces expériences allaient dans le sens d'une inhibition de l'étape de fusion dépendante du pH

Cette idée a été renforcée par l'utilisation d'acridine orange, qui a permis de mettre en évidence une augmentation du pH des compartiments intracellulaires dans les cellules Huh-7 en présence de Monensine. Cependant, ceci ne permettait pas d'exclure un effet de la Monensine sur les capacités fusogéniques de E1 et E2. En effet, la Ferroquine, une base faible proche de la chloroquine, inhibe l'entrée du HCV en affectant les capacités fusogéniques des glycoprotéines d'enveloppe du HCV (Vausselin *et al.*, 2013). Un test de fusion a donc été réalisé (Lavillette *et al.*, 2007) à Lyon, dans le laboratoire de D. Lavillette (données non montrées). Ce test n'a montré aucun effet de la Monensine sur les capacités fusogéniques de E1 et E2, suggérant un rôle de la Monensine sur la fusion via l'augmentation du pH des endosomes.

3- La Monensine inhibe la transmission cellule-cellule

En plus de la voie d'entrée classique décrite précédemment, le HCV se transmet également par une voie directe de transmission dite « cellule-cellule », permettant au virus d'échapper aux anticorps neutralisants (Brimacombe *et al.*, 2011; Timpe *et al.*, 2008). Pour un certain nombre de virus, cette voie de transmission passe par la formation de synapses virologiques entre deux cellules adjacentes. De telles structures ont été particulièrement décrite pour le HIV (Jolly *et al.*, 2004). Cependant, rien de tel n'a jamais été observé pour le HCV. En effet, les mécanismes de cette voie de transmission sont encore très peu caractérisés pour ce virus. Elle impliquerait un certain nombre des facteurs d'entrée du HCV, à savoir SR-BI, CLDN-1, OCLN et CD81, bien que l'implication de cette dernière reste controversée (Brimacombe *et al.*, 2011; Catanese *et al.*, 2013; Timpe *et al.*, 2008). Récemment, plusieurs études ont suggéré que cette voie de transmission était médiée par des exosomes (Bukong *et al.*, 2014; Ramakrishnaiah *et al.*, 2013). Dans notre étude, nous avons montré que la Monensine inhibait la voie de transmission cellule-cellule, ce qui suggère, pour la première fois, que c'est un processus dépendant du pH, et donc qui requiert probablement une étape de fusion.

4- Une population et un clone viral sont moins dépendants du pH et utilisent une voie d'entrée différente de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine

Nous avons généré, par passages successifs de surnageants de cellules infectées par des HCVcc, en présence d'une concentration croissante de Monensine, une

population virale qui s'est avérée être partiellement résistante à la Monensine. Cette population était également partiellement résistante à la chloroquine, une base faible qui inhibe également l'infection par le HCV en augmentant le pH des endosomes (Vausselin *et al.*, 2013). Ceci suggère donc que la population générée était moins dépendante du pH pour son entrée dans ses cellules cibles.

Nous avons isolé au sein de cette population, un clone viral (FL-8) présentant les mêmes caractéristiques que la population totale. De manière surprenante, le clone FL-8 était également partiellement résistant à la chlorpromazine. Or, la chlorpromazine est une molécule qui inhibe la voie d'endocytose dépendante de la clathrine en entraînant une mislocalisation membranaire de la clathrine et de certaines molécules adaptatrices de cette voie. Ceci suggère donc que ce clone résistant est capable, au moins en partie, d'utiliser une voie d'entrée alternative, indépendante de la clathrine et indépendante du pH. Ceci rejoint une étude récente publiée par Matsuda et collaborateurs. Dans cette étude, les auteurs ont montré que le HCV pouvait utiliser une voie d'entrée indépendante de la clathrine, de la dynamine et de la cavéoline. Cependant, dans cette étude, le virus utilisait toujours une voie d'entrée dépendante du pH (Matsuda *et al.*, 2014). Dans notre étude, il serait intéressant par la suite de mieux caractériser la voie d'entrée de nos mutants. Pour cela, nous pourrions analyser l'effet de la transfection de siRNAs dirigés contre la clathrine ou de dominants négatifs et également déterminer si nos mutants sont toujours dépendants de la dynamine II (Liu *et al.*, 2010).

5- Les mutations I399T et Y297H entraînent des changements conformationnels dans les glycoprotéines d'enveloppe

Après séquençage du clone FL-8, nous avons trouvé deux mutations qui confèrent, à elles-seules, une résistance partielle à la Monensine. Une première mutation se situe dans E1, Y297H, et une seconde mutation dans E2, I399T. De manière intéressante, la mutation Y297H avait déjà été isolée lors de la génération de mutants de résistance à la Ferroquine. Or la Ferroquine, bien que par un mécanisme très différent, affecte l'étape du fusion du HCV, comme la Monensine (Vausselin *et al.*, 2013). Ceci renforce donc l'implication de ce résidu dans la fusion, et de E1 dans cette étape de façon plus générale. En effet, l'étape de fusion du HCV est encore très mal caractérisée. Ainsi, pendant longtemps, il a été supposé que E2, par analogie avec la protéine E de

Flavivirus, notamment le TBEV, la protéine E2 pouvait être une protéine de fusion de classe II (Bressanelli *et al.*, 2004; Yagnik *et al.*, 2000). Des déterminants de la fusion ont en plus été identifiés dans E2 : les régions 416 à 430 et 600 à 620 (Lavillette *et al.*, 2007). Un autre segment, 502-520 avait également été proposé comme peptide de fusion (Krey *et al.*, 2010), mais une étude récente suggère que cette séquence n'est pas impliquée dans la fusion (Lavie *et al.*, 2014). Cependant, d'autres études avaient identifié des déterminants de la fusion dans E1. Un peptide de fusion potentiel a ainsi été décrit dans la région C-terminale de E1, entre les résidus 276 et 290 (Lavillette *et al.*, 2007 ; Drummer *et al.*, 2007). Une étude basée sur une approche informatique, afin de déterminer les domaines hydrophobes susceptibles d'être impliqués dans la fusion, a étendu ce domaine jusqu'au résidu 298 (Bruni *et al.*, 2009). De plus, la publication récente d'une partie de la structure cristallographique de l'ectodomaine de E2, montre que cette protéine n'est probablement pas la protéine de fusion (Kong *et al.*, 2013 ; Khan *et al.*, 2014). Il est donc possible que E1 soit la protéine de fusion, ou alors que E1 et E2, en interagissant, forme la protéine de fusion, comme cela a déjà été suggéré (Lavillette *et al.*, 2007 ; Douam *et al.*, 2014). De manière intéressante, notre deuxième mutation conférant une résistance à la Monensine, se situe dans la région HVR1 de E2, renforçant ainsi l'hypothèse de l'implication des deux protéines dans la fusion. De plus, une étude avait montré que le mutant Δ HVR1 fusionnait moins bien que le virus sauvage, ce qui va dans le sens de l'implication de cette région dans la fusion du HCV (Bankwitz *et al.*, 2010).

Afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels ces deux mutations permettent au virus de pénétrer dans ses cellules cibles de manière moins dépendante du pH, nous avons cherché à déterminer l'impact de ces mutations sur la conformation des glycoprotéines d'enveloppe. Tout d'abord, de manière intéressante, la mutation I399T introduit un site de N-glycosylation dans HVR1 et ce site semble effectivement glycosylé, ce qui doit vraisemblablement induire des changements conformationnels dans E2. De plus, des tests de neutralisation réalisés avec des anticorps reconnaissant des épitopes conformationnels dans E2 et dans les hétérodimères E1E2, ont révélé que la mutation I399T modifiait potentiellement la conformation de E2, puisque les mutants I399T et FL-8 étaient moins sensibles à la neutralisation par ces deux anticorps.

Par ailleurs, la région HVR1 est impliquée notamment dans la liaison à SR-BI (Scarselli *et al.*, 2002 ; Callens *et al.*, 2005), mais module également, l'interaction avec

CD81 (Roccsecca *et al.*, 2003). Pour ces raisons, nous avons testé la dépendance de nos mutants à ces deux facteurs d'entrée. Le mutant I399T n'a pas montré de différence de neutralisation par un anticorps anti-CD81. En revanche, nous avons observé que le mutant Y297H était moins sensible à la neutralisation par CD81, ce qui suggère donc que cette mutation induit probablement des changements conformationnels dans E1 qui pourraient se répercuter sur l'hétérodimère E1E2. En revanche, l'absence d'anticorps satisfaisants pour réaliser des expériences de neutralisation, ne nous a pas permis de voir l'effet d'une disponibilité limitée de SR-BI sur l'entrée de nos deux mutants. En effet, les expériences de silencing, en inhibant complètement l'expression de SR-BI, ont seulement permis de vérifier que les mutants étaient encore dépendants de SR-BI pour leur entrée.

Afin de compléter cette étude, et de déterminer l'effet de ces changements conformationnels dans l'étape de fusion il serait intéressant de tester les capacités fusogéniques de nos deux mutants. Pour cela, nous avons déjà généré les constructions permettant de réaliser cette expérience, et notamment, ceci permettrait de savoir si les particules virales produites avec ces mutants fusionnent directement au niveau de la membrane plasmique, comme cela est observé pour de nombreux virus enveloppés, dont l'entrée est indépendante du pH, tel que le HIV (Blumenthal *et al.*, 2012).

6- Les mutations I399T et Y297H entraînent la formation de particules virales moins associées aux lipoprotéines

Nous avons vu que la mutation I399T dans HVR1 et la mutation Y297H, entraînaient vraisemblablement des changements conformationnels dans les hétérodimères E1E2, qui pourraient permettre une étape de fusion indépendante du pH. La région HVR1 de E2 est également impliquée dans l'incorporation des apolipoprotéines (Apo), qui permettent la formation de la lipoviroparticule (Bankwitz *et al.*, 2010 ; Prentoe *et al.*, 2011). De manière intéressante, il a été montré qu'ApoC1, via HVR1, était importante pour la fusion du HCV (Dreux *et al.*, 2007), ce qui renforce non seulement le rôle de HVR1 dans la fusion, mais souligne l'importance des apolipoprotéines dans ce processus. Les ultracentrifugations sur gradients d'iodixanol ont montré que le mutant I399T se comportait de la même manière que le mutant

Δ HVR1, c'est-à-dire conduisait à la production de particules virales de densité plus élevée. Le mutant Y297H présentait quant à lui, une densité intermédiaire. Ceci suggère donc que les mutations I399T et Y297H altèrent l'incorporation de lipides, et potentiellement d'apolipoprotéines dans la particule virale. Une expérience de neutralisation complémentaire, réalisée avec des anticorps anti-ApoE, a révélé que la mutation I399T conduisait à la production de particules virales plus sensibles à cette neutralisation. Deux hypothèses sont alors possibles. Soit le mutant I399T incorpore moins d'ApoE, et est donc plus sensible à la neutralisation et ceci expliquerait le profil de densité observé. Soit, les changements de conformation induits par la mutation exposent plus les épitopes d'ApoE, rendant la particule plus sensible à la neutralisation. En effet, une étude récente a montré qu'un mutant Δ HVR1 incorporait la même quantité d'ApoE que le virus sauvage mais l'ApoE présentait une conformation différente et donc une exposition d'épitopes différente (Bankwitz *et al.*, 2014).

Enfin, puisque nous avons démontré que la transmission cellule-cellule est un processus dépendant du pH, nous avons analysé si nos deux mutations pouvaient avoir un impact sur cette voie de transmission. En effet, nos premiers résultats suggèrent que ces virus pouvaient pénétrer dans leurs cellules cibles par une voie différente des voies classiques. De manière étonnante, la mutation I399T abolissait presque totalement la transmission cellule-cellule. La mutation Y297H affectait également considérablement cette voie, bien que dans une moindre mesure que la mutation I399T. Récemment, une étude a montré l'importance de l'ApoE dans la transmission cellule-cellule (Hueging *et al.*, 2014) indiquant qu'un défaut d'incorporation d'ApoE dans le contexte de la mutation I399T pourrait être responsable de l'absence de transmission cellule-cellule. Cependant, ceci est en contradiction avec une autre étude, qui montrait que le silencing d'ApoE n'affectait pas la transmission cellule-cellule (Baretto *et al.*, 2014).

En conclusion, nous avons montré que la Monensine inhibait l'infection du HCV en bloquant probablement l'étape de fusion via l'augmentation du pH des endosomes. Nous avons montré, de manière intéressante, que la transmission cellule-cellule était un processus dépendant du pH. La génération de mutants de résistance à la Monensine a permis d'isoler deux mutations I399T et Y297H dans les glycoprotéines d'enveloppe, qui permettent aux particules virales de pénétrer dans leurs cellules cibles par une voie d'entrée moins dépendante du pH et de l'endocytose dépendante de la clathrine. En

revanche, ces virus ne se transmettent plus de cellule à cellule, potentiellement par un défaut d'incorporation d'ApoE, qui pourrait être dû aux changements conformationnels induits dans ces protéines et notamment dans la région HVR1.

Bibliographie

A

- Abbate, I., Iacono, Lo, O., Di Stefano, R., Cappiello, G., Girardi, E., Longo, R., Ferraro, D., Antonucci, G., Di Marco, V. & other authors. (2004).** HVR-1 quasispecies modifications occur early and are correlated to initial but not sustained response in HCV-infected patients treated with pegylated- or standard-interferon and ribavirin. *Journal of Hepatology* **40**, 831–836.
- Abdel-Hakeem, M. S. & Shoukry, N. H. (2014).** Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray. *Front Immunol* **5**, 274.
- Abe, K., Inchauspe, G. & Fujisawa, K. (1992).** Genomic characterization and mutation rate of hepatitis C virus isolated from a patient who contracted hepatitis during an epidemic of non-A, non-B hepatitis in Japan. *J Gen Virol* **73**(Pt 10), 2725-2729.
- Abe, N., Lean, I. J., Rabiee, A., Porter, J. & Graham, C. (1994).** Effects of sodium Monensin on reproductive performance of dairy cattle. II. Effects on metabolites in plasma, resumption of ovarian cyclicity and oestrus in lactating cows. *Aust Vet J* **71**, 277–282.
- Abe, T., Kaname, Y., Hamamoto, I., Tsuda, Y., Wen, X., Taguwa, S., Moriishi, K., Takeuchi, O., Kawai, T. & other authors. (2007).** Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *Journal of Virology* **81**, 8953–8966.
- Adair, R., Patel, A. H., Corless, L., Griffin, S., Rowlands, D. J. & McCormick, C. J. (2009).** Expression of hepatitis C virus (HCV) structural proteins in trans facilitates encapsidation and transmission of HCV subgenomic RNA. *J Gen Virol* **90**, 833–842.
- Adovelande, J., Bastide, B., Délèze, J. & Schrével, J. (1993).** Cytosolic free calcium in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and the effect of verapamil: a cytofluorimetric study. *Exp Parasitol* **76**, 247–258.
- Adovelande, J. & Schrével, J. (1996).** Carboxylic ionophores in malaria chemotherapy: the effects of Monensin and nigericin on *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium vinckei petteri* in vivo. *Life Sci* **59**, PL309–15.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q. X. (1999).** Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 12766–12771.
- Agtarap, A. & Chamberlin, J. W. (1967).** Monensin, a new biologically active compound. IV. Chemistry. *Antimicrob Agents Chemother* **7**, 359–362.
- Ahlenstiel, G., Titerence, R. H., Koh, C., Edlich, B., Feld, J. J., Rotman, Y., Ghany, M. G., Hoofnagle, J. H., Liang, T. J. & other authors. (2009).** Natural killer cells are polarized toward cytotoxicity in chronic hepatitis C in an interferon-alfa-dependent manner. *Gastroenterology* **138**, 325–322.
- Aka, P. V., Kuniholm, M. H., Pfeiffer, R. M., Wang, A. S., Tang, W., Chen, S., Astemborski, J., Plankey, M., Villacres, M. C. & other authors. (2014).** Association of the IFNL4-ΔG Allele With Impaired Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus. *J Infect Dis* **209**, 350–354.
- Akazawa, D., Moriyama, M., Yokokawa, H., Omi, N., Watanabe, N., Date, T., Morikawa, K., Aizaki, H., Ishii, K. & other authors. (2013).** Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology* **145**, 447–444.
- Albecka, A., Belouzard, S., de Beeck, A. O., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Tercé, F., Duverlie, G., Rouillé, Y. & Dubuisson, J. (2012).** Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* **55**, 998–

1007.

- Albecka, A., Montserret, R., Krey, T., Tarr, A. W., Diesis, E., Ball, J. K., Descamps, V., Duverlie, G., Rey, F. & other authors. (2011).** Identification of new functional regions in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol* **85**, 1777–1792.
- Ali, S., Pellerin, C., Lamarre, D. & Kukulj, G. (2004).** Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line. *Journal of Virology* **78**, 491–501.
- Alonso, F. V. & Compans, R. W. (1980).** Differential effect of Monensin on enveloped viruses that form at distinct plasma membrane domains. *J Cell Biol* **89**, 700–705.
- Alonso-Caplen, F. V. & Compans, R. W. (1983).** Modulation of glycosylation and transport of viral membrane glycoproteins by a sodium ionophore. *J Cell Biol* **97**, 659–668.
- Alric, L., Fort, M., Izopet, J., Vinel, J. P., Bureau, C., Sandre, K., Charlet, J. P., Beraud, M., Abbal, M. & Duffaut, M. (2000).** Study of host- and virus-related factors associated with spontaneous hepatitis C virus clearance. *Tissue Antigens* **56**, 154–158.
- Alric, L., Fort, M., Izopet, J., Vinel, J. P., Charlet, J. P., Selves, J., Puel, J., Pascal, J. P., Duffaut, M. & Abbal, M. (1997).** Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **113**, 1675–1681.
- Alsina, A. & Valle, N. R.-D. (1984).** Effects of divalent cations and functionally related substances on the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. *Sabouraudia* **22**(1), 1-5.
- Alter, H. J., Purcell, R. H., Holland, P. V. & Popper, H. (1978).** Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* **1**, 459–463.
- Amadei, B., Urbani, S., Cazaly, A., Fisicaro, P., Zerbini, A., Ahmed, P., Missale, G., Ferrari, C. & Khakoo, S. I. (2010).** Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* **138**, 1536–1545.
- Amako, Y., Tsukiyama-Kohara, K., Katsume, A., Hirata, Y., Sekiguchi, S., Tobita, Y., Hayashi, Y., Hishima, T., Funata, N. & other authors. (2010).** Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J Virol* **84**, 303–311.
- Ando, S., Aoyagi, H., Shinagawa, S., Nishino, N., Waki, M., Keto, T. & Izumiya, N. (1983).** [4,4'-D-Diaminopropionic acid]gramicidin S: a synthetic gramicidin S analog with antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. *FEBS Letters* **161**, 89–92.
- André, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., Pol, S., Bréchet, C., Paranhos-Baccalà, G. & Lotteau, V. (2002).** Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *Journal of Virology* **76**, 6919–6928.
- Andréo, U., Maillard, P., Kalinina, O., Walic, M., Meurs, E., Martinot, M., Marcellin, P. & Budkowska, A. (2007).** Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell Microbiol* **9**, 2445–2456.
- Angus, A. G. N. & Patel, A. H. (2011).** Immunotherapeutic potential of neutralizing antibodies targeting conserved regions of the HCV envelope glycoprotein E2. *Future Microbiology* **6**, 279–294.
- Ank, N., West, H. & Paludan, S. R. (2006).** IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *J Interferon Cytokine Res* **26**, 373–379.
- Appel, N., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2005).** Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible

domain. *Journal of Virology* **79**, 3187–3194.

- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U. & Bartenschlager, R. (2008).** Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* **4**, e1000035.
- Arnaud, N., Dabo, S., Akazawa, D., Fukasawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Hugon, J., Wakita, T. & Meurs, E. F. (2011).** Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog* **7**, e1002289–e1002289.
- Arrizabalaga, G., Ruiz, F., Moreno, S. & Boothroyd, J. C. (2004).** Ionophore-resistant mutant of *Toxoplasma gondii* reveals involvement of a sodium/hydrogen exchanger in calcium regulation. *J Cell Biol* **165**, 653–662.
- Atkins, E., Tatineni, R., Li, H., Gretch, D., Harris, M. & Griffin, S. (2014).** The stability of secreted, acid-labile H77/JFH-1 hepatitis C virus (HCV) particles is altered by patient isolate genotype 1a p7 sequences. *Virology* **448**, 117–124.
- Atoom, A. M., Jones, D. M. & Russell, R. S. (2013).** Evidence suggesting that HCV p7 protects E2 glycoprotein from premature degradation during virus production. *Virus Res* **176**, 199–210.
- Atoom, A. M., Taylor, N. G. A. & Russell, R. S. (2014).** The elusive function of the hepatitis C virus p7 protein. *Virology* **462-463**, 377–387.

B

- Baldwin, G., Novitskaya, V., Sadej, R., Pochee, E., Litynska, A., Hartmann, C., Williams, J., Ashman, L., Eble, J. A. & Berditchevski, F. (2008).** Tetraspanin CD151 regulates glycosylation of (alpha)3(beta)1 integrin. *J Biol Chem* **283**, 35445–35454.
- Bamforth, S. D., Kniesel, U., Wolburg, H., Engelhardt, B. & Risau, W. (1999).** A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *J Cell Sci* **112 (Pt 12)**, 1879–1888.
- Banchereau, J., Palucka, A. K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K. M. & other authors. (2001).** Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* **61**, 6451–6458.
- Banerjee, R. & Dasgupta, A. (2001).** Specific interaction of hepatitis C virus protease/helicase NS3 with the 3'-terminal sequences of viral positive- and negative-strand RNA. *Journal of Virology* **75**, 1708–1721.
- Bankwitz, D., Steinmann, E., Bitzegeio, J., Ciesek, S., Friesland, M., Hermann, E., Zeisel, M. B., Baumert, T. F., Keck, Z. Y., Fong, S. K., Pécheur, E. I. & Pietschmann, T. (2010).** Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol* **84**(11), 5751–5763.
- Bankwitz, D., Vieyres, G., Hueging, K., Bitzegeio, J., Doepke, M., Chhatwal, P., Haid, S., Catanese, M. T., Zeisel, M. B. & other authors. (2014).** Role of hypervariable region 1 for the interplay of hepatitis C virus with entry factors and lipoproteins. *Journal of Virology* **88**, 12644–12655.
- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M. J. & other authors. (1997).** Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1200–1205.

- Bari, R., Zhang, Y. H., Zhang, F., Wang, N. X., Stipp, C. S., Zheng, J. J. & Zhang, X. A. (2009).** Transmembrane interactions are needed for KAI1/CD82-mediated suppression of cancer invasion and metastasis. *Am J Pathol* **174**(2), 647-660.
- Baril, M., Racine, M. E., Penin, F. & Lamarre, D. (2009).** α 2-macroglobulin dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of hepatitis C virus NS3/4A protease. *Journal of Virology*.
- Baril, M. & Brakier-Gingras, L. (2005).** Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res* **33**, 1474–1486.
- Barnes, E., Folgori, A., Capone, S., Swadling, L., Aston, S., Kurioka, A., Meyer, J., Huddart, R., Smith, K. & other authors. (2012).** Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Sci Transl Med* **4**, 115ra1.
- Barreiro, O. (2005).** Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood* **105**, 2852–2861.
- Barreiro, O., Zamai, M., Yáñez-Mó, M., Tejera, E., López-Romero, P., Monk, P. N., Gratton, E., Caiolfa, V. R. & Sánchez-Madrid, F. (2008).** Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *The Journal of Cell Biology* **183**, 527–542.
- Barrett, S., Ryan, E. & Crowe, J. (1999).** Association of the HLA-DRB1* 01 allele with spontaneous viral clearance in an Irish cohort infected with hepatitis C virus via contaminated anti-D immunoglobulin. *Journal of Hepatology* **30**(6), 979-983.
- Barretto, N., Sainz, B., Hussain, S. & Uprichard, S. L. (2014).** Determining the involvement and therapeutic implications of host cellular factors in hepatitis C virus cell-to-cell spread. *Journal of Virology* **88**, 5050–5061.
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V. & André, P. (2011a).** Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* **19**(2), 95-103.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V. & Penin, F. (2013).** The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol* **11**, 482–496.
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V. & Andre, P. (2011b).** Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* **19**, 95–103.
- Barth, H., Cerino, R., Arcuri, M., Hoffmann, M., Schürmann, P., Adah, M. I., Gissler, B., Zhao, X., Ghisetti, V. & other authors. (2005).** Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *Journal of Virology* **79**, 5774–5785.
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt, R. J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T. H. & other authors. (2003).** Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* **278**, 41003–41012.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F.-L. (2003).** Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **197**, 633–642.
- Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J.-M., Lavillette, D. & Cosset, F.-L. (2005).** An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *Journal of Virology* **79**, 8217–8229.
- Bashirova, A. A., Geijtenbeek, T. B., van Duijnhoven, G. C., van Vliet, S. J., Eilering, J.**

- B., Martin, M. P., Wu, L., Martin, T. D., Viebig, N. & other authors. (2001).** A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* **193**, 671–678.
- Basselin-Eiweida, M. & Kaneshiro, E. S. (2001).** Detection of two distinct transporter systems for 2-deoxyglucose uptake by the opportunistic pathogen *Pneumocystis carinii*. *Biochim Biophys Acta* **1515**, 177–188.
- Bassett, S. E., Brasky, K. M. & Lanford, R. E. (1998).** Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *Journal of Virology* **72**, 2589–2599.
- Basu, A., Steele, R., Ray, R. & Ray, R. B. (2004).** Functional properties of a 16 kDa protein translated from an alternative open reading frame of the core-encoding genomic region of hepatitis C virus. *J Gen Virol* **85**, 2299–2306.
- Baumert, T. F., Ito, S., Wong, D. T. & Liang, T. J. (1998).** Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *Journal of Virology* **72**, 3827–3836.
- Beglova, N. & Blacklow, S. C. (2005).** The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 309–317.
- Behrens, S. E., Tomei, L. & De Francesco, R. (1996).** Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* **15**, 12–22.
- Bekker, V., Chanock, S. J., Yeager, M., Hutchinson, A. A., Hahn, von, T., Chen, S., Xiao, N., Dotrang, M., Brown, M. & other authors. (2010).** Genetic variation in CLDN1 and susceptibility to hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* **17**, 192–200.
- Beltrame, L. M., Sell, A. M., Moliterno, R. A., Clementino, S. L., Cardozo, D. M., Dalalio, M. M., Fonzar, U. J. & Visentainer, J. E. (2013).** Influence of KIR genes and their HLA ligands in susceptibility to dengue in a population from southern Brazil. *Tissue Antigens* **82**, 397–404.
- Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., Barreiro, O., Maldonado-Rodríguez, A., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Aldabe, R., López-Cabrera, M. & Majano, P. L. (2008).** Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* **48**, 1044–1053.
- Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernández, A., Aldabe, R. & other authors. (2009).** The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *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. & other authors. (2009).** Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **51**, 43–53.
- Benz, D. A., Byers, F. M., Schelling, G. T., Greene, L. W., Lunt, D. K. & Smith, S. B. (1989).** Ionophores alter hepatic concentrations of intermediary carbohydrate metabolites in steers. *J Anim Sci* **67**, 2393–2399.
- Berditchevski, F. (2002).** Expression of the Palmitoylation-deficient CD151 Weakens the Association of alpha 3beta 1 Integrin with the Tetraspanin-enriched Microdomains and Affects Integrin-dependent Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 36991–37000.
- Berditchevski, F., Gilbert, E., Griffiths, M. R., Fitter, S., Ashman, L. & Jenner, S. J. (2001).** Analysis of the CD151{middle dot} 3 1 Integrin and CD151{middle

- dot}Tetraspanin Interactions by Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 41165–41174.
- Bergen, W. G. & Bates, D. B. (1984).** Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *J Anim Sci* **58**, 1465–1483.
- Bibert, S., Roger, T., Calandra, T., Bochud, M., Cerny, A., Semmo, N., Duong, F. H. T., Gerlach, T., Malinverni, R. & other authors. (2013).** IL28B expression depends on a novel TT/-G polymorphism which improves HCV clearance prediction. *Journal of Experimental Medicine* **210**, 1109–1116.
- Bigger, C. B., Brasky, K. M. & Lanford, R. E. (2001).** DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* **75**, 7059–7066.
- Billerbeck, E., de Jong, Y., Dorner, M., de la Fuente, C. & Ploss, A. (2013).** Animal models for hepatitis C. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**, 49-86.
- Binder, M., Quinkert, D., Bochkarova, O., Klein, R., Kezmic, N., Bartenschlager, R. & Lohmann, V. (2007).** Identification of determinants involved in initiation of hepatitis C virus RNA synthesis by using intergenotypic replicase chimeras. *Journal of Virology* **81**, 5270–5283.
- Bissig, K.-D., Le, T. T., Woods, N.-B. & Verma, I. M. (2007).** Repopulation of adult and neonatal mice with human hepatocytes: a chimeric animal model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 20507–20511.
- Bissig, K.-D., Wieland, S. F., Tran, P., Isogawa, M., Le, T. T., Chisari, F. V. & Verma, I. M. (2010).** Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest* **120**, 924–930.
- Blackwell, J. L. & Brinton, M. A. (1997).** Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *Journal of Virology* **71**, 6433–6444.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. & Rouillé, Y. (2006).** Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology* **80**, 6964–6972.
- Blasig, I. E., Winkler, L., Lassowski, B., Mueller, S. L., Zuleger, N., Krause, E., Krause, G., Gast, K., Kolbe, M. & Piontek, J. (2006).** On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *CMLS, Cell Mol Life Sci* **63**, 505–514.
- Blight, K. J., Kolykhalov, A. A. & Rice, C. M. (2000).** Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**, 1972–1974.
- Blight, K. J., McKeating, J. A., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2003).** Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *Journal of Virology* **77**, 3181–3190.
- Blight, K. J., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2002).** Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology* **76**, 13001–13014.
- Blumenthal, R., Durell, S. & Viard, M. (2012).** HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 40841–40849.
- Bode, J. G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Albrecht, U., Erhardt, A., Schaper, F., Heinrich, P. C. & Häussinger, D. (2003).** IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* **17**, 488–490.
- Bolard, J. (1986).** How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta* **864**, 257–304.
- Bolder, N. M., Wagenaar, J. A., Putirulan, F. F., Veldman, K. T. & Sommer, M. (1999).** The effect of flavophospholipol (Flavomycin) and salinomycin sodium (Sacox) on the

- excretion of *Clostridium perfringens*, *Salmonella enteritidis*, and *Campylobacter jejuni* in broilers after experimental infection. *Poult Sci* **78**, 1681–1689.
- Bolen, C. R., Ding, S., Robek, M. D. & Kleinstein, S. H. (2014).** Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology* **59**, 1262–1272.
- Boling, J. A., Bradley, N. W. & Campbell, L. D (1977).** Monensin Levels for Growing and Finishing Steers. *Journal of Animal Science* **44**(5), 867–871.
- Bollepalli, S., Mathieson, K., Jasiurkowski, B., Hillier, A., Post, J., Bhanu, S., Martin, D., Van Thiel, D. H. & Nadir, A. (2008).** A comparison of risk factors for HCV-mono-infection, HIV-mono-infection, and HCV/HIV-co-infection in a community setting. *Dig Dis Sci* **53**, 517–521.
- Bonifacino, J. S. & Dell'Angelica, E. C. (1999).** Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol* **145**, 923–926.
- Boson, B., Granio, O., Bartenschlager, R. & Cosset, F.-L. (2011).** A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS Pathog* **7**, e1002144.
- Boulant, S., Becchi, M., Penin, F. & Lavergne, J.-P. (2003).** Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J Biol Chem* **278**, 45785–45792.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F. & Lavergne, J.-P. (2005).** Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *Journal of Virology* **79**, 11353–11365.
- Boulant, S., Targett-Adams, P., & McLauchlan, J. (2007).** Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *The Journal of General Virology*, **88**(Pt 8), 2204–2213.
- Bourinbaiar, A. S. & Coleman, C. F. (1997).** The effect of gramicidin, a topical contraceptive and antimicrobial agent with anti-HIV activity, against herpes simplex viruses type 1 and 2 in vitro. *Arch Virol* **142**, 2225–2235.
- Boyer, A., Dumans, A., Beaumont, E., Etienne, L., Roingeard, P. & Meunier, J.-C. (2014).** The association of hepatitis C virus glycoproteins with apolipoproteins E and B early in assembly is conserved in lipoviral particles. *J Biol Chem* **289**, 18904–18913.
- Boyer, J. L. (2013).** Bile formation and secretion. *Compr Physiol* **3**, 1035–1078.
- Boyer, J. L. (2014).** The hepatobiliary paracellular pathway: a paradigm revisited. *Gastroenterology* **147**, 965–968.
- Bozzano, F., Picciotto, A., Costa, P., Marras, F., Fazio, V., Hirsch, I., Olive, D., Moretta, L. & De Maria, A. (2011).** Activating NK cell receptor expression/function (NKp30, NKp46, DNAM-1) during chronic viraemic HCV infection is associated with the outcome of combined treatment. *Eur J Immunol* **41**, 2905–2914.
- Brajtburg, J., Powderly, W. G., Kobayashi, G. S. & Medoff, G. (1990).** Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 183–188.
- Branch, A. D., Stump, D. D., Gutierrez, J. A., Eng, F. & Walewski, J. L. (2005).** The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* **25**, 105–117.
- Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S. T., Otte, J.-M., Diebold, J., Diepolder, H., Adler, B. & other authors. (2005a).** IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV

- infection increases colonic IL-28A expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G960–8.
- Brand, S., Zitzmann, K., Dambacher, J., Beigel, F., Olszak, T., Vlotides, G., Eichhorst, S. T., Göke, B., Diepolder, H. & Auernhammer, C. J. (2005b).** SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon- λ s IL-28A and IL-29. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331**, 543–548.
- Brass, V., Berke, J. M., Montserret, R., Blum, H. E., Penin, F. & Moradpour, D. (2008).** Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 14545–14550.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wölk, B., Hellings, J. A., Blum, H. E., Penin, F. & Moradpour, D. (2002).** An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* **277**, 8130–8139.
- Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M. & Crotta, S. (2008).** CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol* **82**, 8316–8329.
- Brazzoli, M., Helenius, A., Fong, S. K. H., Houghton, M., Abrignani, S. & Merola, M. (2005).** Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells. *Virology* **332**, 438–453.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R. & Rey, F. A. (1999).** Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 13034–13039.
- Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S. L., Stura, E. A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F. X. & Rey, F. A. (2004).** Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J* **23**, 728–738.
- Brimacombe, C. L., Grove, J., Meredith, L. W., Hu, K., Syder, A. J., Flores, M. V., Timpe, J. M., Krieger, S. E., Baumert, T. F. & other authors. (2011).** Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* **85**, 596–605.
- Brocato, J., Chervona, Y. & Costa, M. (2013).** Molecular responses to hypoxia-inducible factor 1 α and beyond. *Mol Pharmacol* **85**, 651–657.
- Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Lorenz, I. C., Patel, A., Penin, F., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2009).** Characterization of determinants important for hepatitis C virus p7 function in morphogenesis by using trans-complementation. *J Virol* **83**, 11682–11693.
- Bruni, R., Costantino, A., Tritarelli, E., Marcantonio, C., Ciccozzi, M., Rapicetta, M., Sawaf, El, G., Giuliani, A. & Ciccaglione, A. R. (2009).** A computational approach identifies two regions of Hepatitis C Virus E1 protein as interacting domains involved in viral fusion process. *BMC Struct Biol* **9**, 48.
- Bryson, M. F. & Drake, H. L. (1988).** Energy-dependent transport of nickel by *Clostridium pasteurianum*. *J Bacteriol* **170**, 234–238.
- Bukong, T. N., Momen-Heravi, F., Kodys, K., Bala, S. & Szabo, G. (2014).** Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90. *PLoS Pathog* **10**, e1004424–e1004424.
- Buonocore, L., Blight, K. J., Rice, C. M. & Rose, J. K. (2002).** Characterization of vesicular stomatitis virus recombinants that express and incorporate high levels of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of Virology* **76**, 6865–6872.

- Burdette, D., Haskett, A., Presser, L., McRae, S., Iqbal, J. & Waris, G. (2012).** Hepatitis C virus activates interleukin-1 β via caspase-1-inflammasome complex. *Journal of General Virology* **93**, 235–246.
- Butaye, P., Devriese, L. A. & Haesebrouck, F. (2003).** Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed: Effects of Less Well Known Antibiotics on Gram-Positive Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **16**, 175–188.

C

- Cailleteau, L., Estrach, S., Thyss, R., Boyer, L., Doye, A., Domange, B., Johnsson, N., Rubinstein, E., Boucheix, C. & other authors. (2010).** α 2 β 1 integrin controls association of Rac with the membrane and triggers quiescence of endothelial cells. *Journal of Cell Science* **123**, 2491–2501.
- Caldeira, C., Neves, W. S., Cury, P. M., Serrano, P., Baptista, M. A. & Burdmann, E. A. (2001).** Rhabdomyolysis, acute renal failure, and death after Monensin ingestion. *Am J Kidney Dis* **38**, 1108–1112.
- Calland N., Albecka A., Belouzard S., Wychowski C., Duverlie G., Descamps V., Hober D., Dubuisson J., Rouillé Y., & Séron K. (2012).** (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology* **55**(3), 720–729.
- Callens, N., Ciczora, Y., Bartosch, B., Vu-Dac, N., Cosset, F.-L., Pawlotsky, J.-M., Penin, F. & Dubuisson, J. (2005).** Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *Journal of Virology* **79**, 15331–15341.
- Cameron, B., Galbraith, S., Li, H., Lloyd, A. HITS investigators. (2013).** Correlates and characteristics of hepatitis C virus-specific T-cell immunity in exposed uninfected high-risk prison inmates. *J Viral Hepat* **20**, e96–106.
- Cao, L., Bombard, J., Cintron, K., Sheedy, J., Weetall, M. L. & Davis, T. W. (2011).** BMI1 as a novel target for drug discovery in cancer. *J Cell Biochem* **112**, 2729–2741.
- Cardin, R., Saccoccio, G., Masutti, F., Bellentani, S., Farinati, F. & Tiribelli, C. (2001).** DNA oxidative damage in leukocytes correlates with the severity of HCV-related liver disease: validation in an open population study. *Journal of Hepatology* **34**, 587–592.
- Carrère-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F. & Dubuisson, J. (2002).** Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *Journal of Virology* **76**, 3720–3730.
- Castro-Sánchez, A., Shkedy, Z., Hens, N., Aerts, M., Geskus, R., Prins, M., Wiessing, L. & Kretzschmar, M. (2012).** Estimating the force of infection for HCV in injecting drug users using interval-censored data. *Epidemiol Infect* **140**, 1064–1074.
- Catanese, M. T., Ansuini, H., Graziani, R., Huby, T., Moreau, M., Ball, J. K., Paonessa, G., Rice, C. M., Cortese, R. & other authors. (2010).** Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. *J Virol* **84**, 34–43.
- Catanese, M. T., Graziani, R., Hahn, von, T., Moreau, M., Huby, T., Paonessa, G., Santini, C., Luzzago, A., Rice, C. M. & other authors. (2007).** High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *Journal of Virology* **81**, 8063–8071.
- Catanese, M. T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T. J., Andrus, L., Rice, W. J., Silvestry, M., Kuhn, R. J. & Rice, C. M. (2013).** Ultrastructural analysis of hepatitis C virus

- particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 9505–9510.
- Ceppa, L., Nachtmann, C., Dacasto, M., Carletti, M. & Nebbia, C. (1997).** Comparative hepatic microsomal metabolism of Monensin in food-producing species. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **20**(Suppl. 1), 106–106.
- Chandler, D. E., Penin, F., Schulten, K. & Chipot, C. (2012).** The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. *PLoS Comput Biol* **8**, e1002702.
- Chang, K.-S., Jiang, J., Cai, Z. & Luo, G. (2007a).** Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* **81**, 13783–13793.
- Chang, M., Williams, O., Mittler, J., Quintanilla, A., Carithers, R. L., Perkins, J., Corey, L. & Gretch, D. R. (2003).** Dynamics of hepatitis C virus replication in human liver. *Am J Pathol* **163**, 433–444.
- Chang, S., Dolganiuc, A. & Szabo, G. (2007b).** Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J Leukoc Biol* **82**, 479–487.
- Chapman, H. D. (1984).** Drug resistance in avian coccidia (a review). *Vet Parasitol* **15**, 11–27.
- Chapman, H. D. (1999).** Anticoccidial drugs and their effects upon the development of immunity to *Eimeria* infections in poultry. *Avian Pathol* **28**, 521–535.
- Chapman, H. D., Jeffers, T. K. & Williams, R. B. (2010).** Forty years of Monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poult Sci* **89**, 1788–1801.
- Charrin, S., LE NAOUR, F., Silvie, O., Milhiet, P.-E., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2009).** Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J* **420**, 133–154.
- Charrin, S., Manié, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2002).** Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Letters* **516**, 139–144.
- Charrin, S., Manié, S., Thiele, C., Billard, M., Gerlier, D., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2003).** A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *Eur J Immunol* **33**, 2479–2489.
- Chatterji, U., Bobardt, M. D., Lim, P. & Gallay, P. A. (2010a).** Cyclophilin A-independent recruitment of NS5A and NS5B into hepatitis C virus replication complexes. *J Gen Virol* **91**, 1189–1193.
- Chatterji, U., Lim, P., Bobardt, M. D., Wieland, S., Cordek, D. G., Vuagniaux, G., Chisari, F., Cameron, C. E., Targett-Adams, P. & other authors. (2010b).** HCV resistance to cyclosporin A does not correlate with a resistance of the NS5A-cyclophilin A interaction to cyclophilin inhibitors. *Journal of Hepatology* **53**, 50–56.
- Chen, P.-C., Chuang, P.-K., Chen, C.-H., Chan, Y.-T., Chen, J.-R., Lin, S.-W., Ma, C., Hsu, T.-L. & Wong, C.-H. (2014).** Role of N-linked glycans in the interactions of recombinant HCV envelope glycoproteins with cellular receptors. *ACS Chem Biol* **9**, 1437–1443.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J. & Marks, R. M. (1997).** Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* **3**, 866–871.
- Cheng, Y.-Q. (2006).** Deciphering the biosynthetic codes for the potent anti-SARS-CoV cyclodepsipeptide valinomycin in *Streptomyces tsusimaensis* ATCC 15141. *Chembiochem* **7**, 471–477.
- Chevaliez, S. & Pawlotsky, J.-M. (2012).** Virology of hepatitis C virus infection. *Best*

- Pract Res Clin Gastroenterol* **26**, 381–389.
- Choi, S.-H., Park, K.-J., Ahn, B.-Y., Jung, G., Lai, M. M. C. & Hwang, S. B. (2006).** Hepatitis C virus nonstructural 5B protein regulates tumor necrosis factor alpha signaling through effects on cellular I κ B kinase. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 3048–3059.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Van Nest, G., Han, J., Berger, K., Thudium, K. & Kuo, C. (1994).** Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 1294–1298.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989).** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359–362.
- Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (1998).** Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of Virology* **72**, 3851–3858.
- Christensen, J. J., Hill, J. O. & Izatt, R. M. (1971).** Ion binding by synthetic macrocyclic compounds. *Science* **174**, 459–467.
- Christie, J. M., Healey, C. J., Watson, J., Wong, V. S., Duddridge, M., Snowden, N., Rosenberg, W. M., Fleming, K. A., Chapel, H. & Chapman, R. W. (1997).** Clinical outcome of hypogammaglobulinaemic patients following outbreak of acute hepatitis C: 2 year follow up. *Clin Exp Immunol* **110**, 4–8.
- Ciczora, Y., Callens, N., Montpellier, C., Bartosch, B., Cosset, F.-L., de Beeck, A. O. & Dubuisson, J. (2005).** Contribution of the charged residues of hepatitis C virus glycoprotein E2 transmembrane domain to the functions of the E1E2 heterodimer. *J Gen Virol* **86**, 2793–2798.
- Ciczora, Y., Callens, N., Penin, F., Pécheur, E.-I. & Dubuisson, J. (2007).** Transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins: residues involved in E1E2 heterodimerization and involvement of these domains in virus entry. *Journal of Virology* **81**, 2372–2381.
- Ciesek, S., Westhaus, S., Wicht, M., Wappler, I., Henschen, S., Sarrazin, C., Hamdi, N., Abdelaziz, A. I., Strassburg, C. P. & other authors. (2011).** Impact of intra- and interspecies variation of occludin on its function as coreceptor for authentic hepatitis C virus particles. *Journal of Virology* **85**, 7613–7621.
- Cirioni, O., Giacometti, A., Barchiesi, F. & Scalise, G. (1998).** In-vitro activity of lytic peptides alone and in combination with macrolides and inhibitors of dihydrofolate reductase against *Pneumocystis carinii*. *J Antimicrob Chemother* **42**, 445–451.
- Claas, C., Stipp, C. S. & Hemler, M. E. (2001).** Evaluation of Prototype Transmembrane 4 Superfamily Protein Complexes and Their Relation to Lipid Rafts. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 7974–7984.
- Clark, K. L., Oelke, A., Johnson, M. E., Eilert, K. D., Simpson, P. C. & Todd, S. C. (2004).** CD81 associates with 14-3-3 in a redox-regulated palmitoylation-dependent manner. *J Biol Chem* **279**, 19401–19406.
- Clarke, D., Griffin, S., Beales, L., Gelais, C. S., Burgess, S., Harris, M. & Rowlands, D. (2006).** Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro. *J Biol Chem* **281**, 37057–37068.
- Clayton, R. F., Owsianka, A., Aitken, J., Graham, S., Bhella, D. & Patel, A. H. (2002).** Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. *Journal of Virology* **76**, 7672–7682.
- Cobos, M. A., Ley de Coss, A., Ramirez, N. D., Gonzalez, S. S. & Ferrera Cerrato, R. (2011).** *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen

- acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to Monensin and lasalocid. *Res Vet Sci* **90**, 26–30.
- Cockrell, R. S., Harris, E. J. & Pressman, B. C. (1967).** Synthesis of ATP driven by a Potassium Gradient in Mitochondria. *Nature* **215**, 1487–1488.
- Cocquerel, L., Duvet, S., Meunier, J. C., Pillez, A., Cacan, R., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (1999).** The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* **73**, 2641–2649.
- Cocquerel, L., Meunier, J. C., Op de Beeck, A., Bonte, D., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (2001).** Coexpression of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 in cis improves the stability of membrane insertion of E2. *J Gen Virol* **82**, 1629–1635.
- Cocquerel, L., Meunier, J. C., Pillez, A., Wychowski, C. & Dubuisson, J. (1998).** A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *Journal of Virology* **72**, 2183–2191.
- Cocquerel, L., Wychowski, C., Minner, F., Penin, F. & Dubuisson, J. (2000).** Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *Journal of Virology* **74**, 3623–3633.
- Cocquerel, L., Kuo, C.-C., Dubuisson, J. & Levy, S. (2003).** CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers. *Journal of Virology* **77**, 10677–10683.
- Coelmont, L., Kaptein, S., Paeshuyse, J., Vliegen, I., Dumont, J.-M., Vuagniaux, G. & Neyts, J. (2009).** Debio 025, a cyclophilin binding molecule, is highly efficient in clearing hepatitis C virus (HCV) replicon-containing cells when used alone or in combination with specifically targeted antiviral therapy for HCV (STAT-C) inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 967–976.
- Coller, K. E., Berger, K. L., Heaton, N. S., Cooper, J. D., Yoon, R. & Randall, G. (2009).** RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog* **5**, e1000702.
- Coller, K. E., Heaton, N. S., Berger, K. L., Cooper, J. D., Saunders, J. L. & Randall, G. (2011).** Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog* **8**, e1002466–e1002466.
- Collier, A. J., Gallego, J., Klinck, R., Cole, P. T., Harris, S. J., Harrison, G. P., Aboul-Ela, F., Varani, G. & Walker, S. (2002).** A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site. *Nat Struct Biol* **9**, 375–380.
- Colonna, M. (1997).** Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Immunol Rev* **155**, 127–133.
- Contoli, M., Message, S. D., Laza-Stanca, V., Edwards, M. R., Wark, P. A. B., Bartlett, N. W., Kebabdz, T., Mallia, P., Stanciu, L. A. & other authors. (2006).** Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat Med* **12**, 1023–1026.
- Cooper, S., Erickson, A. L., Adams, E. J., Kansopon, J., Weiner, A. J., Chien, D. Y., Houghton, M., Parham, P. & Walker, C. M. (1999).** Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* **10**, 439–449.
- Cormier, E. G., Durso, R. J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W. C., Gardner, J. P. & Dragic, T. (2004).** L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 14067–14072.
- Counihan, N. A., Rawlinson, S. M. & Lindenbach, B. D. (2011).** Trafficking of hepatitis

C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS Pathog* **7**, e1002302–e1002302.

- Couzinet, S., Dubremetz, J. F., Buzoni-Gatel, D., Jeminet, G. & Prensier, G. (2000).** In vitro activity of the polyether ionophorous antibiotic Monensin against the cyst form of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* **121** (Pt 4), 359–365.
- Cox, A. L., Mosbrugger, T., Mao, Q., Liu, Z., Wang, X.-H., Yang, H.-C., Sidney, J., Sette, A., Pardoll, D. & other authors. (2005).** Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* **201**, 1741–1752.
- Coyne, C. B. & Bergelson, J. M. (2005).** CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 869–882.
- Cramp, M. E., Carucci, P., Underhill, J., Naoumov, N. V., Williams, R. & Donaldson, P. T. (1998).** Association between HLA class II genotype and spontaneous clearance of hepatitis C viraemia. *Journal of Hepatology* **29**, 207–213.
- Crispe, I. N. (2009).** The liver as a lymphoid organ. *Annual Review of Immunology* **27**, 147–163.
- Cukierman, L., Meertens, L., Bertaux, C., Kajumo, F. & Dragic, T. (2009).** Residues in a highly conserved claudin-1 motif are required for hepatitis C virus entry and mediate the formation of cell-cell contacts. *Journal of Virology* **83**, 5477–5484.
- Cun, W., Jiang, J. & 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

- Da Costa, D., Turek, M., Felmlee, D. J., Girardi, E., Pfeffer, S., Long, G., Bartenschlager, R., Zeisel, M. B. & Baumert, T. F. (2012).** Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in nonhepatic cells. *J Virol* **86**, 11919–11925.
- Dafa-Berger, A., Kuzmina, A., Fassler, M., Yitzhak-Asraf, H., Shemer-Avni, Y. & Taube, R. (2012).** Modulation of hepatitis C virus release by the interferon-induced protein BST-2/tetherin. *Virology* **428**, 98–111.
- Danglot, L., Chaineau, M., Dahan, M., Gendron, M.-C., Boggetto, N., Perez, F. & Galli, T. (2010).** Role of TI-VAMP and CD82 in EGFR cell-surface dynamics and signaling. *Journal of Cell Science* **123**, 723–735.
- David, J. M., Owens, T. A., Inge, L. J., Bremner, R. M. & Rajasekaran, A. K. (2014).** Gramicidin A blocks tumor growth and angiogenesis through inhibition of hypoxia-inducible factor in renal cell carcinoma. *Mol Cancer Ther* **13**, 788–799.
- David, N., Yaffe, Y., Hagoel, L., Elazar, M., Glenn, J. S., Hirschberg, K. & Sklan, E. H. (2015).** The interaction between the Hepatitis C proteins NS4B and NS5A is involved in viral replication. *Virology* **475**, 139–149.
- Davis, C., Harris, H. J., Hu, K., Drummer, H. E., McKeating, J. A., Mullins, J. G. L. & Balfe, P. (2012).** In silico directed mutagenesis identifies the CD81/claudin-1 hepatitis C virus receptor interface. *Cell Microbiol* **14**, 1892–1903.
- Dayekh, K., Johnson-Obaseki, S., Corsten, M., Villeneuve, P. J., Sekhon, H. S., Weberpals, J. I. & Dimitroulakos, J. (2014).** Monensin inhibits epidermal growth factor receptor trafficking and activation: synergistic cytotoxicity in combination with EGFR inhibitors. *Mol Cancer Ther* **13**, 2559–2571.
- Dazert, E., Neumann-Haefelin, C., Bressanelli, S., Fitzmaurice, K., Kort, J., Timm, J., McKiernan, S., Kelleher, D., Gruener, N. & other authors. (2009).** Loss of viral fitness and cross-recognition by CD8+ T cells limit HCV escape from a protective

- HLA-B27-restricted human immune response. *J Clin Invest* **119**, 376–386.
- de Lédighen, V., Trimoulet, P., Mannant, P.-R., Dumas, F., Champbenoît, P., Baldit, C., Foucher, J., Faure, M., Vergniol, J. & other authors. (2007).** Outbreak of hepatitis C virus infection during sclerotherapy of varicose veins: long-term follow-up of 196 patients (4535 patient-years). *Journal of Hepatology* **46**, 19–25.
- de Parseval, A., Lerner, D. L., Borrow, P., Willett, B. & Elder, J. H. (1997).** Blocking of feline immunodeficiency virus infection by a monoclonal antibody to CD9 is via inhibition of virus release rather than interference with receptor binding. *J Virol* **71**, 5742–5749.
- Deest, M., Westhaus, S., Steinmann, E., Manns, M. P., Hahn, von, T. & Ciesek, S. (2014).** Impact of single nucleotide polymorphisms in the essential HCV entry factor CD81 on HCV infectivity and neutralization. *Antiviral Res* **101**, 37–44.
- del Cacho, E., Gallego, M., Sánchez-Acedo, C. & Lillehoj, H. S. (2007).** Expression of flotillin-1 on *Eimeria tenella* sporozoites and its role in host cell invasion. *J Parasitol* **93**, 328–332.
- Delandre, C., Penabaz, T. R., Passarelli, A. L., Chapes, S. K. & Clem, R. J. (2009).** Mutation of juxtamembrane cysteines in the tetraspanin CD81 affects palmitoylation and alters interaction with other proteins at the cell surface. *Exp Cell Res* **315**, 1953–1963.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997).** Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of Virology* **71**, 697–704.
- Delgrange, D., Pillez, A., Castelain, S., Cocquerel, L., Rouillé, Y., Dubuisson, J., Wakita, T., Duverlie, G. & Wychowski, C. (2007).** Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* **88**, 2495–2503.
- Delputte, P. L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H. J. & Pensaert, M. B. (2002).** Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *Journal of Virology* **76**, 4312–4320.
- Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E. & Marsh, M. (2007).** In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *The Journal of Cell Biology* **177**, 329–341.
- Deng, C.-C., Liang, Y., Wu, M.-S., Feng, F.-T., Hu, W.-R., Chen, L.-Z., Feng, Q.-S., Bei, J.-X. & Zeng, Y.-X. (2013).** Nigericin selectively targets cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **45**, 1997–2006.
- Descamps, V., Op de Beeck, A., Plassart, C., Brochet, E., François, C., Helle, F., Adler, M., Bourgeois, N., Degré, D. & other authors. (2012).** Strong correlation between liver and serum levels of hepatitis C virus core antigen and RNA in chronically infected patients. *J Clin Microbiol* **50**, 465–468.
- Dewar, R. L., Vasudevachari, M. B., Natarajan, V. & Salzman, N. P. (1989).** Biosynthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins: effects of Monensin on glycosylation and transport. *Journal of Virology* **63**, 2452–2456.
- di Iulio, J., Ciuffi, A., Fitzmaurice, K., Kelleher, D., Rotger, M., Fellay, J., Martinez, R., Pulit, S., Furrer, H. & other authors. (2011).** Estimating the net contribution of interleukin-28B variation to spontaneous hepatitis C virus clearance. *Hepatology* **53**,

1446–1454.

- Diao, J., Pantua, H., Ngu, H., Komuves, L., Diehl, L., Schaefer, G. & Kapadia, S. B. (2012).** Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. *Journal of Virology* **86**, 10935–10949.
- Dibrov, S. M., Johnston-Cox, H., Weng, Y.-H. & Hermann, T. (2006).** Functional architecture of HCV IRES domain II stabilized by divalent metal ions in the crystal and in solution. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**, 226–229.
- Diegelmann, J., Beigel, F., Zitzmann, K., Kaul, A., Göke, B., Auernhammer, C. J., Bartenschlager, R., Diepolder, H. M. & Brand, S. (2009).** 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–e15200.
- Diepolder, H. M., Hoffmann, R. M., Gerlach, J. T., Zachoval, R., Jung, M. C. & Pape, G. R. (1998).** Immunopathogenesis of HCV infection. *Curr Stud Hematol Blood Transfus* **135**–151.
- DiPersio, C. M., Hodivala-Dilke, K. M., Jaenisch, R., Kreidberg, J. A. & Hynes, R. O. (1997).** alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J Cell Biol* **137**, 729–742.
- Dobler, M., Dunitz, J. D. & Krajewski, J. (1969).** Structure of the K⁺ complex with enniatin B, a macrocyclic antibiotic with K⁺ transport properties. *J Mol Biol* **42**(3), 603–606.
- Doherty, D. G. & O'Farrelly, C. (2000).** Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* **174**, 5–20.
- Dohle, A., Schmahl, G., Raether, W., Schmidt, H. & Ritter, G. (2002).** Effects of orally administered chemotherapeutics (quinine, salinomycin) against *Heneguya* sp. *Thelohán*, 1892 (Myxozoa: Myxobolidae), a gill parasite in the tapir fish *Gnathonemus petersii* Günther, 1862 (Teleostei). *Parasitol Res* **88**, 861–867.
- Dolganiuc, A., Oak, S., Kodys, K., Golenbock, D. T., Finberg, R. W., Kurt-Jones, E. & Szabo, G. (2004).** Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* **127**, 1513–1524.
- Donahue, J. G., Muñoz, A., Ness, P. M., Brown, D. E., Jr., Yawn, D. H., McAllister, H. A., Jr., Reitz, B. A. & Nelson, K. E. (1992).** The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **327**, 369–373.
- Dong, J. T., Lamb, P. W., Rinker-Schaeffer, C. W., Vukanovic, J., Ichikawa, T., Isaacs, J. T. & Barrett, J. C. (1995).** KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* **268**, 884–886.
- Donnelly, R. P. & Kotenko, S. V. (2010).** Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interferon Cytokine Res* **30**, 555–564.
- Donnelly, R. P., Sheikh, F., Kotenko, S. V. & Dickensheets, H. (2004).** The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *J Leukoc Biol* **76**, 314–321.
- Donoho, A. L. (1984).** Biochemical studies on the fate of Monensin in animals and in the environment. *J Anim Sci* **58**, 1528–1539.
- Donoho, A., Manthey, J. & Occolowitz, J. (1978).** Metabolism of Monensin in the steer and rat. *Journal of agricultural Food Chemistry* **26**, 1090–1095
- 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. & other authors. (2011).** A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* **474**, 208–

- Dorner, M., Horwitz, J. A., Donovan, B. M., Labitt, R. N., Budell, W. C., Friling, T., Vogt, A., Catanese, M. T., Satoh, T. & other authors. (2013).** Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature* **501**, 237–241.
- Dornetshuber, R., Heffeter, P., Kamyar, M.-R., Peterbauer, T., Berger, W. & Lemmens-Gruber, R. (2007).** Enniatin exerts p53-dependent cytostatic and p53-independent cytotoxic activities against human cancer cells. *Chem Res Toxicol* **20**, 465–473.
- Douam, F., Dao Thi, V. L., Maurin, G., Fresquet, J., Mompelat, D., Zeisel, M. B., Baumert, T. F., Cosset, F.-L. & Lavillette, D. (2014).** Critical interaction between E1 and E2 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell entry. *Hepatology* **59**, 776–788.
- Dreux, M., Boson, B., Ricard-Blum, S., Molle, J., Lavillette, D., Bartosch, B., Pécheur, E.-I. & Cosset, F.-L. (2007).** The exchangeable apolipoprotein ApoC-I promotes membrane fusion of hepatitis C virus. *J Biol Chem* **282**, 32357–32369.
- Dreux, M., Garaigorta, U., Boyd, B., Décembre, E., Chung, J., Whitten-Bauer, C., Wieland, S. & Chisari, F. V. (2012).** Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe* **12**, 558–570.
- Dreux, M., Thi, V. L. D., Fresquet, J., Guérin, M., Julia, Z., Verney, G., Durantel, D., Zoulim, F., Lavillette, D. & other authors. (2009).** Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathog* **5**, e1000310.
- Dring, M. M., Morrison, M. H., McSharry, B. P., Guinan, K. J., Hagan, R., Irish HCV Research Consortium, O'Farrelly, C. & Gardiner, C. M. (2011).** Innate immune genes synergize to predict increased risk of chronic disease in hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 5736–5741.
- Drummer, H. E. & Pombourios, P. (2004).** Hepatitis C virus glycoprotein E2 contains a membrane-proximal heptad repeat sequence that is essential for E1E2 glycoprotein heterodimerization and viral entry. *Journal of Biological Chemistry* **279**(29), 30066–30072.
- Drummer, H. E., Boo, I. & Pombourios, P. (2007).** Mutagenesis of a conserved fusion peptide-like motif and membrane-proximal heptad-repeat region of hepatitis C virus glycoprotein E1. *J Gen Virol* **88**, 1144–1148.
- Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G. & Rice, C. M. (1994).** Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *Journal of Virology* **68**, 6147–6160.
- Ducoulombier, D., Roque-Afonso, A.-M., Di Liberto, G., Penin, F., Kara, R., Richard, Y., Dussaix, E. & Féray, C. (2004).** Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology* **39**, 817–825.
- Duffield, A., Kamsteeg, E.-J., Brown, A. N., Pagel, P. & Caplan, M. J. (2003).** The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 15560–15565.
- Dumoutier, L., Lejeune, D., Hör, S., Fickenscher, H. & Renaud, J.-C. (2003).** Cloning of a new type II cytokine receptor activating signal transducer and activator of transcription (STAT)1, STAT2 and STAT3. *Biochem J* **370**, 391–396.
- Dumoutier, L., Tounsi, A., Michiels, T., Sommereyns, C., Kotenko, S. V. & Renaud, J.-C. (2004).** Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral

and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J Biol Chem* **279**, 32269–32274.

Dutta, G. N. & Devriese, L. A. (1984). Observations on the in vitro sensitivity and resistance of Gram positive intestinal bacteria of farm animals to growth promoting antimicrobial agents. *Journal of applied bacteriology* **56**(1), 117-123.

E

Edrington, T. S., Callaway, T. R., Bischoff, K. M., Genovese, K. J., Elder, R. O., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2003). Effect of feeding the ionophores Monensin and laidlomycin propionate and the antimicrobial bambarmycin to sheep experimentally infected with *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Animal Science* **81**(2), 553–560.

Edwardson, J. M. (1984). Effects of Monensin on the processing and intracellular transport of influenza virus haemagglutinin in infected MDCK cells. *J Cell Sci* **65**, 209–221.

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

Einav, S., Elazar, M., Danieli, T. & Glenn, J. S. (2004). A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *Journal of Virology* **78**, 11288–11295.

Ejigiri, I. & Sinnis, P. (2009). Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Curr Opin Microbiol* **12**, 401–407.

El-Serag, H. B. & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* **132**, 2557–2576.

Elford, B. C., Cowan, G. M. & Ferguson, D. J. (1995). Parasite-regulated membrane transport processes and metabolic control in malaria-infected erythrocytes. *Biochem J* **308**(Pt 2), 361-374.

Elliott, L. N., Lloyd, A. R., Ziegler, J. B. & Ffrench, R. A. (2006). Protective immunity against hepatitis C virus infection. *Immunology and Cell Biology* **84**, 239–249.

El Omari, K., Iourin, O., Kadlec, J., Sutton, G., Harlos, K., Grimes, J. M., Stuart, D. I. (2014). Unexpected structure for the N-terminale domain of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1. *Nature Communications*, doi: 10.1038/ncomms5874.

English, D. P. & Santin, A. D. (2013). Claudins Overexpression in Ovarian Cancer: Potential Targets for Clostridium Perfringens Enterotoxin (CPE) Based Diagnosis and Therapy. *Int J Mol Sci* **14**, 10412–10437.

Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O. & Geuze, H. J. (1998). Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 20121–20127.

Espenel, C., Margeat, E., Dosset, P., Arduise, C., Le Grimellec, C., Royer, C. A., Boucheix, C., Rubinstein, E. & Milhiet, P.-E. (2008). Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *The Journal of Cell Biology* **182**, 765–776.

Esser-Nobis, K., Romero-Brey, I., Ganten, T. M., Gouttenoire, J., Harak, C., Klein, R., Schemmer, P., Binder, M., Schnitzler, P. & other authors. (2013). Analysis of hepatitis C virus resistance to silibinin in vitro and in vivo points to a novel

mechanism involving nonstructural protein 4B. *Hepatology* **57**, 953–963.

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

Evans, M. J., Rice, C. M. & Goff, S. P. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 13038–13043.

F

Falco, M., Moretta, L., Moretta, A. & Bottino, C. (2013). KIR and KIR ligand polymorphism: a new area for clinical applications? *Tissue Antigens* **82**, 363–373.

Falcon, V., García, C., Rosa, M. C. de L., Menendez, I., Seoane, J. & Grillo, J. M. (1999). Ultrastructural and immunocytochemical evidences of core-particle formation in the methylotrophic *Pichia pastoris* yeast when expressing HCV structural proteins (core-E1). *Tissue and Cell* **31**, 117–125.

Falkowska, E., Kajumo, F., Garcia, E., Reinus, J. & Dragic, T. (2007). Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *Journal of Virology* **81**, 8072–8079.

Fang, A., Wong, G. K. & Demain, A. L. (2000). Enhancement of the antifungal activity of rapamycin by the coproduced elaiophylin and nigericin. *J Antibiot* **53**, 158–162.

Fanning, L. J., Levis, J., Kenny-Walsh, E., Wynne, F., Whelton, M. & Shanahan, F. (2000). Viral clearance in hepatitis C (1b) infection: relationship with human leukocyte antigen class II in a homogeneous population. *Hepatology* **31**, 1334–1337.

Farci, P., Alter, H. J., Govindarajan, S., Wong, D. C., Engle, R., Lesniewski, R. R., Mushahwar, I. K., Desai, S. M., Miller, R. H. & Ogata, N. (1992). Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* **258**, 135–140.

Farci, P., Munoz, S. J., Shimoda, A., Govindarajan, S., Wong, D. C., Coiana, A., Peddis, G., Rubin, R. & Purcell, R. H. (1999). Experimental transmission of hepatitis C virus-associated fulminant hepatitis to a chimpanzee. *J Infect Dis* **179**, 1007–1011.

Farhat, R., Goueslain, L., Wychowski, C., Belouzard, S., Fénéant, L., Jackson, C. L., Dubuisson, J. & Rouillé, Y. (2013). Hepatitis C virus replication and Golgi function in brefeldin a-resistant hepatoma-derived cells. *PLoS ONE* **8**, e74491.

Farquhar, M. J., Hu, K., Harris, H. J., Davis, C., Brimacombe, C. L., Fletcher, S. J., Baumert, T. F., Rappoport, J. Z., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2012). Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J Virol* **86**, 4305–4316.

Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. & Holland, P. V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* **292**, 767–770.

Ferraris, P., Blanchard, E. & Roingeard P. (2010). Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol* **91** (Pt 9), 2230–2237

Fénéant, L., Levy, S. & Cocquerel, L. (2014). CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses* **6**, 535–572.

Figdor, C. G., van Kooyk, Y. & Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 77–84.

Fiorucci, M., Boulant, S., Fournillier, A., Abraham, J. D., Lavergne, J.-P., Paranhos-Baccalà, G., Inchauspé, G. & Bain, C. (2007). Expression of the alternative reading

- frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *J Gen Virol* **88**, 1149–1162.
- Flannery, A. R., Czibener, C. & Andrews, N. W. (2010).** Palmitoylation-dependent association with CD63 targets the Ca²⁺ sensor synaptotagmin VII to lysosomes. *The Journal of Cell Biology* **191**, 599–613.
- Fletcher, N. F., Sutaria, R., Jo, J., Barnes, A., Blahova, M., Meredith, L. W., Cosset, F.-L., Curbishley, S. M., Adams, D. H. & other authors. (2014).** Activated macrophages promote hepatitis C virus entry in a tumor necrosis factor-dependent manner. *Hepatology* **59**, 1320–1330.
- Flint, M., Dubuisson, J., Maidens, C., Harrop, R., Guile, G. R., Borrow, P. & McKeating, J. A. (2000).** Functional characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of Virology* **74**, 702–709.
- Flint, M., Hahn, von, T., Zhang, J., Farquhar, M., Jones, C. T., Balfe, P., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2006).** Diverse CD81 Proteins Support Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* **80**, 11331–11342.
- Florentin, J., Aouar, B., Dental, C., Thumann, C., Firaguay, G., Gondois-Rey, F., Soumelis, V., Baumert, T. F., Nunès, J. A. & other authors. (2012).** HCV glycoprotein E2 is a novel BDCA-2 ligand and acts as an inhibitor of IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **120**, 4544–4551.
- Fofana, I., Krieger, S. E., Grunert, F., Glaubens, S., Xiao, F., Fafi-Kremer, S., Soulier, E., Royer, C., Thumann, C. & other authors. (2010).** Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* **139**, 953–64– 964.e1–4.
- Folgori, A., Capone, S., Ruggeri, L., Meola, A., Sporeno, E., Ercole, B. B., Pezzanera, M., Tafi, R., Arcuri, M. & other authors. (2006).** A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* **12**, 190–197.
- Forgeat, G. (2013).** Deficit energetique avant et apres vèlage chez la vache laitiere : les liens entre les indicateurs.
- Forton, D. M., Karayiannis, P., Mahmud, N., Taylor-Robinson, S. D. & Thomas, H. C. (2004a).** Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *Journal of Virology* **78**, 5170–5183.
- Forton, D. M., Thomas, H. C. & Taylor-Robinson, S. D. (2004b).** Central nervous system involvement in hepatitis C virus infection. *Metab Brain Dis* **19**, 383–391.
- Fournillier, A., Frelin, L., Jacquier, E., Ahlén, G., Brass, A., Gerossier, E., Holmström, F., Broderick, K. E., Sardesai, N. Y. & other authors. (2013).** A heterologous prime/boost vaccination strategy enhances the immunogenicity of therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J Infect Dis* **208**, 1008–1019.
- Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Loo, Y.-M., Johnson, C. L., Wang, C., Fish, P. M., Yoneyama, M., Fujita, T. & other authors. (2005).** Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 2986–2991.
- Freeman, A. J., Ffrench, R. A., Post, J. J., Harvey, C. E., Gilmour, S. J., White, P. A., Marinos, G., van Beek, I., Rawlinson, W. D. & Lloyd, A. R. (2004).** Prevalence of Production of Virus-Specific Interferon- γ among Seronegative Hepatitis C-Resistant Subjects Reporting Injection Drug Use. *Journal of Infectious Diseases* **190**, 1093–1097.
- Frey, S. E., Houghton, M., Coates, S., Abrignani, S., Chien, D., Rosa, D., Pileri, P., Ray,**

- R., Di Bisceglie, A. M. & other authors. (2010).** Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* **28**, 6367–6373.
- Friborg, J., Levine, S., Chen, C., Sheaffer, A. K., Chaniewski, S., Voss, S., Lemm, J. A. & McPhee, F. (2013).** Combinations of lambda interferon with direct-acting antiviral agents are highly efficient in suppressing hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 1312–1322.
- Frick, D. N., Rypma, R. S., Lam, A. M. I. & Gu, B. (2004).** The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. *J Biol Chem* **279**, 1269–1280.
- Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J.-P. & Bartenschlager, R. (2005).** Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *Journal of Virology* **79**, 380–392.
- Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinou, G., Gonçales, F. L., Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G. & other authors. (2002).** Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med* **347**, 975–982.
- Fuchs, D., Daniel, V., Sadeghi, M., Opelz, G. & Naujokat, C. (2010).** Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **394**, 1098–1104.
- Furtado, T. A., Cisalpino, E. O. & Santos, U. M. (1960).** In vitro Studies of the Effect of Amphotericin B in *Leishmania brasiliensis*. *Antibiotics & Chemotherapy* **10**, 692–3. New York.
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. & Tsukita, S. (1994).** Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* **127**, 1617–1626.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K. & Tsukita, S. (1998).** A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* **143**, 391–401.

G

- Galewsky, S., Hope, J. K. & Rickoll, W. L. (1988).** The effects of Monensin on 20-hydroxyecdysone-induced glycoprotein secretion and aggregation in *Drosophila* S3 cells. *Ecdysone: From Biosynthesis to Mode of Action* **34**, 661–668.
- Gan, S. W., Surya, W., Vararattanavech, A. & Torres, J. (2014).** Two different conformations in hepatitis C virus p7 protein account for proton transport and dye release. *PLoS ONE* **9**, e78494.
- Gao, M., Nettles, R. E., Belema, M., Snyder, L. B., Van N Nguyen, Fridell, R. A., Serrano-Wu, M. H., Langley, D. R., Sun, J.-H. & other authors. (2010).** Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* **465**, 96–100.
- Garaigorta, U. & Chisari, F. V. (2009).** Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* **6**, 513–522.
- Garcia, C. R., Ann, S. E., Tavares, E. S., Dluzewski, A. R., Mason, W. T. & Paiva, F. B. (1998).** Acidic calcium pools in intraerythrocytic malaria parasites. *Eur J Cell Biol* **76**, 133–138.
- Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J.-F., Blot, G., Leuba,**

- F., Escola, J.-M., Demaurex, N. & other authors. (2005).** HIV-1 Trafficking to the Dendritic Cell-T-Cell Infectious Synapse Uses a Pathway of Tetraspanin Sorting to the Immunological Synapse. *Traffic* **6**, 488–501.
- Gardner, J. P., Durso, R. J., Arrigale, R. R., Donovan, G. P., Maddon, P. J., Dragic, T. & Olson, W. C. (2003).** L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 4498–4503.
- Garrone, P., Fluckiger, A.-C., Mangeot, P. E., Gauthier, E., Dupeyrot-Lacas, P., Mancip, J., Cangialosi, A., Chéné, Du, I., LeGrand, R. & other authors. (2011).** A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques. *Sci Transl Med* **3**, 94ra71.
- Garry, R. F. & Dash, S. (2003).** Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology* **307**, 255–265.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W. & Chisari, F. V. (2008).** Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* **82**, 2120–2129.
- Gastaminza, P., Kapadia, S. B. & Chisari, F. V. (2006).** Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *Journal of Virology* **80**, 11074–11081.
- Gause, G. F. & Brazhnikova, M. G. (1944).** Gramicidin S and its use in the Treatment of Infected Wounds. *Nature* **154**, 703–703.
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., Heinzen, E. L., Qiu, P., Bertelsen, A. H. & other authors. (2009).** Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **461**, 399–401.
- Ge, R. & Sun, X. (2014).** Iron acquisition and regulation systems in *Streptococcus* species. *Metallomics* **6**, 996–1003.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y. & Figdor, C. G. (2000).** Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**, 575–585.
- Gentsch, J., Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Menzel, N., Vieyres, G., Perin, P. M., Frentzen, A., Kaderali, L. & Pietschmann, T. (2013).** hepatitis c Virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment. *PLoS Pathog* **9**, e1003355.
- Germi, R. L., Crance, J.-M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W. H., Zarski, J.-P. & Drouet, E. (2002).** Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol* **68**, 206–215.
- Gertenbach, P. G. & Popov, A. I. (1975).** Solution chemistry of Monensin and its alkali metal ion complexes. Potentiometric and spectroscopic studies. *J Am Chem Soc* **97**, 4738–4744.
- Ghany, M. G., Strader, D. B., Thomas, D. L. & Seeff, L. B. (2009).** Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. *Hepatology* **49**, 1335–1374. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
- Ghosh, J., Fouquet, B., Quertainmont, Y., Salmon, D., Sahali, S., Rioux, C., Duvivier, C., Mole, M., Delfraissy, J.-F. & Misrahi, M. (2015).** Claudin-1 gene variants and susceptibility to hepatitis C infection in HIV-1 infected intravenous drug users (an ANRS case-control study). *J Med Virol* **87**(4), 619–624.
- Gibot, S., Jeminet, G., Juillard, J., Gumila, C., Ancelin, M. L., Vial, H. & Delort, A. M. (1999).** Cationomycin and Monensin partition between serum proteins and

- erythrocyte membrane: consequences for Na⁺ and K⁺ transport and antimalarial activities. *Arch Biochem Biophys* **363**, 361–372.
- Ginsberg, H. (1990).** Alterations caused by the intraerythrocytic malaria parasite in the permeability of its host cell membrane. *Comparative Biochemistry and Physiology* **95**(1), 31-39.
- Go, G.-W. & Mani, A. (2012).** Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med* **85**, 19–28.
- Goffard, A., Callens, N., Bartosch, B., Wychowski, C., Cosset, F.-L., Montpellier, C. & Dubuisson, J. (2005).** Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Journal of Virology* **79**, 8400–8409.
- Golden-Mason, L., Cox, A. L., Randall, J. A., Cheng, L. & Rosen, H. R. (2010).** Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology* **52**, 1581–1589.
- Golden-Mason, L. & Rosen, H. R. (2013).** Natural killer cells: multifaceted players with key roles in hepatitis C immunity. *Immunol Rev* **255**, 68–81.
- Golden-Mason, L., Stone, A. E. L., Bambha, K. M., Cheng, L. & Rosen, H. R. (2012).** Race- and gender-related variation in natural killer p46 expression associated with differential anti-hepatitis C virus immunity. *Hepatology* **56**, 1214–1222.
- Gonzalez, V., Combe, A., David, V., Malmquist, N. A., Delorme, V., Leroy, C., Blazquez, S., Ménard, R. & Tardieux, I. (2009).** Host cell entry by apicomplexa parasites requires actin polymerization in the host cell. *Cell Host Microbe* **5**, 259–272.
- Goodrich, R. D., Garrett, J. E., Gast, D. R., Kirick, M. A., Larson, D. A. & Meiske, J. C. (1984).** Influence of Monensin on the performance of cattle. *J Anim Sci* **58**, 1484–1498.
- Gottwein, J. M., Scheel, T. K. H., Jensen, T. B., Ghanem, L. & Bukh, J. (2011).** Differential efficacy of protease inhibitors against HCV genotypes 2a, 3a, 5a, and 6a NS3/4A protease recombinant viruses. *Gastroenterology* **141**, 1067–1079.
- Gottwein, J. M., Scheel, T. K. H., Jensen, T. B., Lademann, J. B., Prentoe, J. C., Knudsen, M. L., Hoegh, A. M. & Bukh, J. (2009).** Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* **49**, 364–377.
- Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J. & Rouillé, Y. (2009).** Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology* **84**, 773–787.
- Gouklani, H., Bull, R. A., Beyer, C., Coulibaly, F., Gowans, E. J., Drummer, H. E., Netter, H. J., White, P. A. & Haqshenas, G. (2012).** Hepatitis C virus nonstructural protein 5B is involved in virus morphogenesis. *Journal of Virology* **86**, 5080–5088.
- Gouttenoire, J., Montserret, R., Kennel, A., Penin, F. & Moradpour, D. (2009).** An amphipathic alpha-helix at the C terminus of hepatitis C virus nonstructural protein 4B mediates membrane association. *Journal of Virology* **83**, 11378–11384.
- Gouttenoire, J., Roingeard, P., Penin, F. & Moradpour, D. (2010).** Amphipathic alpha-helix AH2 is a major determinant for the oligomerization of hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *Journal of Virology* **84**, 12529–12537.
- Gowans, E. J., Roberts, S., Jones, K., Dinatale, I., Latour, P. A., Chua, B., Eriksson, E. M. Y., Chin, R., Li, S. & other authors. (2010).** A phase I clinical trial of dendritic cell immunotherapy in HCV-infected individuals. *Journal of Hepatology* **53**, 599–607.
- Grahovac, B., Bingulac-Popović, J., Vucelić, B., Hrستیć, I., Ostojić, R., Drazić, V., Balija,**

- M. & Grgicević, D. (2000).** Hypervariable region 1 of hepatitis C virus genome and response to interferon therapy. *Clin Chem Lab Med* **38**, 905–910.
- Grakoui, A., Shoukry, N. H., Woollard, D. J., Han, J.-H., Hanson, H. L., Ghayeb, J., Murthy, K. K., Rice, C. M. & Walker, C. M. (2003).** HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* **302**, 659–662.
- Gratkowski, H., Lear, J. D. & DeGrado, W. F. (2001).** Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 880–885.
- Greco, C., Bralet, M.-P., Ailane, N., Dubart-Kupperschmitt, A., Rubinstein, E., LE NAOUR, F. & Boucheix, C. (2010).** E-cadherin/p120-catenin and tetraspanin Co-029 cooperate for cell motility control in human colon carcinoma. *Cancer Research* **70**, 7674–7683.
- Gretton, S. N., Taylor, A. I. & McLauchlan, J. (2005).** Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol* **86**, 1415–1421.
- Griffin, S. D. C., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P. G. & Rowlands, D. J. (2003).** The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Letters* **535**, 34–38.
- Griffin, S. D. C., Harvey, R., Clarke, D. S., Barclay, W. S., Harris, M. & Rowlands, D. J. (2004).** A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* **85**, 451–461.
- Grompe, M., al-Dhalimy, M., Finegold, M., Ou, C. N., Burlingame, T., Kennaway, N. G. & Soriano, P. (1993).** Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice. *Genes Dev* **7**, 2298–2307.
- Grove, J., Huby, T., Stamataki, Z., Vanwolleghem, T., Meuleman, P., Farquhar, M., Schwarz, A., Moreau, M., Owen, J. S. & other authors. (2007).** Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity. *Journal of Virology* **81**, 3162–3169.
- Gu, M. & Rice, C. M. (2010).** Three conformational snapshots of the hepatitis C virus NS3 helicase reveal a ratchet translocation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 521–528.
- Guitart, A., Riezu-Boj, J.-I., Elizalde, E., Larrea, E., Berasain, C., Aldabe, R., Civeira, M. P. & Prieto, J. (2005).** Hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes leads to selection of quasispecies variants, induction of interferon-stimulated genes and NF-kappaB nuclear translocation. *J Gen Virol* **86**, 3065–3074.
- Gumila, C., Ancelin, M. L., Delort, A. M., Jeminet, G. & Vial, H. J. (1997).** Characterization of the potent in vitro and in vivo antimalarial activities of ionophore compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 523–529.
- Gumila, C., Ancelin, M. L., Jeminet, G., Delort, A. M., Miquel, G. & Vial, H. J. (1996).** Differential in vitro activities of ionophore compounds against *Plasmodium falciparum* and mammalian cells. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 602–608.
- Guo, Q., Xia, B., Zhang, F., Richardson, M. M., Li, M., Zhang, J. S., Chen, F. & Zhang, X. A. (2012).** Tetraspanin CO-029 inhibits colorectal cancer cell movement by deregulating cell-matrix and cell-cell adhesions. *PLoS ONE* **7**, e38464.
- Gupta, E., Bajpai, M. & Choudhary, A. (2013).** Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian J Transfus Sci* **8**, 19–25.
- Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A. & Lander, E. S. (2009).** Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by

high-throughput screening. *Cell* **138**, 645–659.

H

- Haansuu, J. P., Klika, K. D. & Söderholm, P. P. (2001).** Isolation and biological activity of frankiamide. *Journal of Industrial ...*
- Haberstroh, A., Schnober, E. K., Zeisel, M. B., Carolla, P., Barth, H., Blum, H. E., Cosset, F.-L., Koutsoudakis, G., Bartenschlager, R. & other authors. (2008).** Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* **135**, 1719–1728.e1.
- Hagan, H., Pouget, E. R., Jarlais, Des, D. C. & Lelutiu-Weinberger, C. (2008).** Meta-regression of hepatitis C virus infection in relation to time since onset of illicit drug injection: the influence of time and place. *Am J Epidemiol* **168**, 1099–1109.
- Hahn, von, T., Lindenbach, B. D., Boullier, A., Quehenberger, O., Paulson, M., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2006).** Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology* **43**, 932–942.
- Hahn, von, T., Schiene-Fischer, C., Van, N. D., Pfaender, S., Karavul, B., Steinmann, E., Potthoff, A., Strassburg, C., Hamdi, N. & other authors. (2012).** Hepatocytes that express variants of cyclophilin A are resistant to HCV infection and replication. *Gastroenterology* **143**, 439–47.e1.
- Hahn, von, T., Yoon, J. C., Alter, H., Rice, C. M., Rehmann, B., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2007).** Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* **132**, 667–678.
- Haid, S., Grethe, C., Dill, M. T., Heim, M., Kaderali, L. & Pietschmann, T. (2014).** Isolate-dependent use of claudins for cell entry by hepatitis C virus. *Hepatology* **59**, 24–34.
- Haid, S., Pietschmann, T. & Pécheur, E.-I. (2009).** Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J Biol Chem* **284**, 17657–17667.
- Haller, A. A., Lauer, G. M., King, T. H., Kemmler, C., Fiolkoski, V., Lu, Y., Bellgrau, D., Rodell, T. C., Apelian, D. & other authors. (2007).** Whole recombinant yeast-based immunotherapy induces potent T cell responses targeting HCV NS3 and Core proteins. *Vaccine* **25**, 1452–1463.
- Haller, C., Müller, B., Fritz, J. V., Lamas-Murua, M., Stolp, B., Pujol, F. M., Keppler, O. T. & Fackler, O. T. (2014).** HIV-1 Nef and Vpu are functionally redundant broad-spectrum modulators of cell surface receptors, including tetraspanins. *J Virol* **88**, 14241–14257.
- Hamming, O. J., Gad, H. H., Paludan, S. & Hartmann, R. (2010).** Lambda Interferons: New Cytokines with Old Functions. *Pharmaceuticals* **3**, 795–809.
- Hamming, O. J., Terczyńska-Dyła, E., Vieyres, G., Dijkman, R., Jørgensen, S. E., Akhtar, H., Siupka, P., Pietschmann, T., Thiel, V. & Hartmann, R. (2013).** Interferon lambda 4 signals via the IFN λ receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. *EMBO J* **32**, 3055–3065.
- Hanouille, X., Badillo, A., Wieruszkeski, J.-M., Verdegem, D., Landrieu, I., Bartenschlager, R., Penin, F. & Lippens, G. (2009).** Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilins A and B. *J Biol Chem* **284**, 13589–13601.
- Hanson, L. J., Eisenbeis, H. G. & Givens, S. V. (1981).** Toxic effects of lasalocid in horses. *American Journal of Veterinary Research*, **42**(3), 456–461.

- Harris, H. J. (2008).** CD81 and Claudin 1 co-receptor association: a role in hepatitis C virus entry. *J Virol* **82**, 5007-5020.
- Harris, H. J., Clerte, C., Farquhar, M. J., Goodall, M., Hu, K., Rassam, P., Dosset, P., Wilson, G. K., Balfe, P. & other authors. (2013).** Hepatoma polarization limits CD81 and hepatitis C virus dynamics. *Cell Microbiol* **15**, 430-445.
- Harris, H. J., Davis, C., Mullins, J. G. L., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M. J., Mee, C. J., McCaffrey, K., Young, S. & other authors. (2010).** Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 21092-21102.
- Harris, H. J., Farquhar, M. J., Mee, C. J., Davis, C., Reynolds, G. M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H. & other authors. (2008).** CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* **82**, 5007-5020.
- Harrison, M. S., Sakaguchi, T. & Schmitt, A. P. (2010).** Paramyxovirus assembly and budding: Building particles that transmit infections. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **42**, 1416-1429.
- Haucke, V. & Krauss, M. (2002).** Tyrosine-based endocytic motifs stimulate oligomerization of AP-2 adaptor complexes. *Eur J Cell Biol* **81**, 647-653.
- Haudecoeur, R., Peuchmaur, M., Ahmed-Belkacem, A., Pawlotsky, J.-M. & Boumendjel, A. (2013).** Structure-activity relationships in the development of allosteric hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibitors: ten years of research. *Med Res Rev* **33**, 934-984.
- Hayes, D. P., Pfeiffer, D. U. & Williamson, N. B. (1996).** Effect of intraruminal Monensin capsules on reproductive performance and milk production of dairy cows fed pasture. *J Dairy Sci* **79**, 1000-1008.
- He, J., Sun, E., Bujny, M. V., Kim, D., Davidson, M. W. & Zhuang, X. (2013a).** Dual function of CD81 in influenza virus uncoating and budding. *PLoS Pathog* **9**, e1003701.
- He, L., Wang, F., Dai, W.-Q., Wu, D., Lin, C.-L., Wu, S.-M., Cheng, P., Zhang, Y., Shen, M. & other authors. (2013b).** Mechanism of action of salinomycin on growth and migration in pancreatic cancer cell lines. *Pancreatology* **13**, 72-78.
- Heck, J. A., Meng, X. & Frick, D. N. (2009).** Cyclophilin B stimulates RNA synthesis by the HCV RNA dependent RNA polymerase. *Biochem Pharmacol* **77**, 1173-1180.
- Helbig, K. J., Eyre, N. S., Yip, E., Narayana, S., Li, K., Fiches, G., McCartney, E. M., Jangra, R. K., Lemon, S. M. & Beard, M. R. (2011).** The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A. *Hepatology* **54**, 1506-1517.
- Helenius, A., Kielian, M., Wellsted, J. & Mellman, I. (1985).** Effects of monovalent cations on Semliki Forest virus entry into BHK-21 cells. *J Biol Chem* **260**(9), 5691-5697.
- Helle, F., Duverlie, G. & Dubuisson, J. (2011).** The hepatitis C virus glycan shield and evasion of the humoral immune response. *Viruses* **3**, 1909-1932.
- Helle, F., Goffard, A., Morel, V., Duverlie, G., McKeating, J., Keck, Z.-Y., Fong, S., Penin, F., Dubuisson, J. & Voisset, C. (2007).** The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *Journal of Virology* **81**, 8101-8111.
- Helle, F., Vieyres, G., Elkrief, L., Popescu, C.-I., Wychowski, C., Descamps, V., Castelain, S., Roingeard, P., Duverlie, G. & Dubuisson, J. (2010).** Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol* **84**, 11905-11915.
- Henke, J. I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C. G., Fehr, C., Jünemann, C. &**

- Niepmann, M. (2008).** microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* **27**, 3300–3310.
- Hennig, B. J. W., Hellier, S., Frodsham, A. J., Zhang, L., Klenerman, P., Knapp, S., Wright, M., Thomas, H. C., Thursz, M. & Hill, A. V. S. (2002).** Association of low-density lipoprotein receptor polymorphisms and outcome of hepatitis C infection. *Genes Immun* **3**, 359–367.
- Hennig, B. J., Frodsham, A. J., Hellier, S., Knapp, S., Yee, L. J., Wright, M., Zhang, L., Thomas, H. C., Thursz, M. & Hill, A. V. (2007).** Influence of IL-10RA and IL-22 polymorphisms on outcome of hepatitis C virus infection. *Liver Int* **27**, 1134–1143.
- Herald, F. & Knapp, F. W. (1980).** Effects of Monensin on development of the face fly and the horn fly. *J Econ Entomol* **73**, 762–763.
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A. R., Farese, R. V. & Ott, M. (2010).** Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med* **16**, 1295–1298.
- Hernandez-Gea, V. & Friedman, S. L. (2011).** Platelets arrive at the scene of fibrosis..... studies. *Journal of Hepatology*.
- Hoekstra, M., Van Berkel, T.-J. & Van Eck, M. (2010).** Scavenger receptor BI: a multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism. *World J Gastroenterol* **16**, 5916–5924.
- Hoffman, B. & Liu, Q. (2011).** Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. *Liver Int* **31**, 1449–1467.
- Holmén, B. A. & Casey, W. H. (1996).** Hydroxamate ligands, surface chemistry, and the mechanism of ligand-promoted dissolution of goethite [α -FeOOH(s)]. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **60**, 4403–4416.
- Homsi, Y., Schloetel, J.-G., Scheffer, K. D., Schmidt, T. H., Destainville, N., Florin, L. & Lang, T. (2014).** The extracellular δ -domain is essential for the formation of CD81 tetraspanin webs. *Biophysical Journal* **107**, 100–113.
- Honda, M., Ping, L. H., Rijnbrand, R. C., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D. & Lemon, S. M. (1996).** Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* **222**, 31–42.
- Hong, I.-K., Jeoung, D.-I., Ha, K.-S., Kim, Y.-M. & Lee, H. (2012).** Tetraspanin CD151 stimulates adhesion-dependent activation of Ras, Rac, and Cdc42 by facilitating molecular association between β 1 integrins and small GTPases. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 32027–32039.
- Hoofnagle, J. H., Mullen, K. D., Jones, D. B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Waggoner, J. G., Park, Y. & Jones, E. A. (1986).** Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* **315**, 1575–1578.
- Hoofnagle, J. H. (2002).** Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* **36**, S21–9.
- Hope, R. G. & 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.
- Horner, S. M. (2014).** Activation and evasion of antiviral innate immunity by hepatitis C virus. *J Mol Biol* **426**, 1198–1209.
- Horner, S. M., Liu, H. M., Park, H. S., Briley, J. & Gale, M. (2011).** Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 14590–14595.

- Horvath, G., Serru, V., Clay, D., Billard, M., BOUCHEIX, C. & Rubinstein, E. (1998).** CD19 Is Linked to the Integrin-associated Tetraspans CD9, CD81, and CD82. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 30537–30543.
- Hoshino, H., Hino, K., Miyakawa, H., Takahashi, K., Akbar, S. M. F. & Mishiro, S. (2012).** Inter-genotypic recombinant hepatitis C virus strains in Japan noted by discrepancies between immunoassay and sequencing. *J Med Virol* **84**, 1018–1024.
- Hotchkiss, R. D. & Dubos R. J. (1941).** The isolation of bactericidal substances from cultures of *Bacillus brevis*. *J. Biol. Chem.* **141**, 155-162.
- Houldsworth, A., Metzner, M. M., Demaine, A., Hodgkinson, A., Kaminski, E. & Cramp, M. (2014).** CD81 sequence and susceptibility to hepatitis C infection. *J Med Virol* **86**, 162–168.
- Houldsworth, A., Metzner, M., Rossol, S., Shaw, S., Kaminski, E., Demaine, A. G. & Cramp, M. E. (2005).** Polymorphisms in the IL-12B Gene and Outcome of HCV Infection. *J Interferon Cytokine Res* **25**, 271–276. Mary Ann Liebert, Inc., publishers.
- Hör, S., Pirzer, H., Dumoutier, L., Bauer, F., Wittmann, S., Sticht, H., Renauld, J.-C., de Waal Malefyt, R. & Fickenscher, H. (2004).** The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J Biol Chem* **279**, 33343–33351.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003).** Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 7271–7276.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D. M., Li, W., Chen, Y., Gale, M. & Ye, J. (2007a).** Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 5848–5853.
- Huang, J., Smirnov, S. V., Lewis-Antes, A., Balan, M., Li, W., Tang, S., Silke, G. V., Pütz, M. M., Smith, G. L. & Kotenko, S. V. (2007b).** Inhibition of type I and type III interferons by a secreted glycoprotein from Yaba-like disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 9822–9827.
- Huang, L., Hwang, J., Sharma, S. D., Hargittai, M. R. S., Chen, Y., Arnold, J. J., Raney, K. D. & Cameron, C. E. (2005).** Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* **280**, 36417–36428.
- Huang, S., Tian, H., Chen, Z., Yu, T. & Xu, A. (2010).** The evolution of vertebrate tetraspanins: gene loss, retention, and massive positive selection after whole genome duplications. *BMC Evol Biol* **10**, 306.
- Huang, Y., Yang, H., Borg, B. B., Su, X., Rhodes, S. L., Yang, K., Tong, X., Tang, G., Howell, C. D. & other authors. (2007c).** A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 985–990.
- Huczyński, A., Janczak, J., Łowicki, D. & Brzezinski, B. (2012).** Monensin A acid complexes as a model of electrogenic transport of sodium cation. *Biochim Biophys Acta* **1818**(9), 2108–2119.
- Hueging, K., Doepke, M., Vieyres, G., Bankwitz, D., Frentzen, A., Doerrbecker, J., Gumz, F., Haid, S., Wölk, B. & other authors. (2014).** Apolipoprotein E codetermines tissue tropism of hepatitis C virus and is crucial for viral cell-to-cell transmission by contributing to a postenvelopment step of assembly. *Journal of Virology* **88**, 1433–1446.
- Huhtanen, C. N. & Pensack, J. M. (1967).** Effect of antifungal compounds on aspergillosis in hatching chick embryos. *Appl Microbiol* **15**, 102–109.
- Hurley, S. F., Jolley, D. J. & Kaldor, J. M. (1997).** Effectiveness of needle-exchange

programmes for prevention of HIV infection. *Lancet* **349**, 1797–1800.

Hurtado, C. W., Golden-Mason, L., Brocato, M., Krull, M., Narkewicz, M. R. & Rosen, H. R. (2009). Innate immune function in placenta and cord blood of hepatitis C--seropositive mother-infant dyads. *PLoS ONE* **5**, e12232–e12232.

Hügler, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Kräusslich, H.-G., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2001). The Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Is an Integral Endoplasmic Reticulum Membrane Protein. *Virology* **284**, 70–81.

Hwang, J., Huang, L., Cordek, D. G., Vaughan, R., Reynolds, S. L., Kihara, G., Raney, K. D., Kao, C. C. & Cameron, C. E. (2010). Hepatitis C virus nonstructural protein 5A: biochemical characterization of a novel structural class of RNA-binding proteins. *Journal of Virology* **84**, 12480–12491.

/

Iacovacci, S., Bertolini, L., Manzin, A., Valli, M. B., Battaglia, M., Ponzetto, A., Clementi, M. & Carloni, G. (1997). Quantitation of hepatitis C virus RNA production in two human bone marrow-derived B-cell lines infected in vitro. *Res Virol* **148**, 147–151.

Iacovacci, S., Sargiacomo, M., Parolini, I., Ponzetto, A., Peschle, C. & Carloni, G. (1993). Replication and multiplication of hepatitis C virus genome in human foetal liver cells. *Res Virol* **144**, 275–279.

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

Ilan, E., Arazi, J., Nussbaum, O., Zauberman, A., Eren, R., Lubin, I., Neville, L., Ben-Moshe, O., Kischitzky, A. & other authors. (2002). The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV. *J Infect Dis* **185**, 153–161.

Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X. & Núñez, G. (1998). CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* **17**, 2526–2533.

Irurzun, A. & Carrasco, L. (2001). Entry of poliovirus into cells is blocked by valinomycin and concanamycin A. *Biochemistry* **40**, 3589–3600.

Irurzun, A., Sánchez-Palomino, S., Novoa, I. & Carrasco, L. (1995). Monensin and nigericin prevent the inhibition of host translation by poliovirus, without affecting p220 cleavage. *Journal of Virology* **69**, 7453–7460.

Ishikawa, F. (2005). Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor chainnull mice. *Blood* **106**, 1565–1573.

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. & Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* **147**, 1351–1363.

Ivanov, V. T., Laine, I. A., Abdulaev, N. D., Senyavina, L. B., Popov, E. M., Ovchinnikov, Y. A. & Shemyakin, M. M. (1969). The physicochemical basis of the functioning of biological membranes: The conformation of valinomycin and its K⁺ complex in solution. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **34**, 803–811.

Iversen, M. B. & Paludan, S. R. (2010). Mechanisms of type III interferon expression. *J Interferon Cytokine Res* **30**, 573–578.

Iwamoto, R. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as a diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which upregulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO J* **13**, 2322–2330.

J

- Jacobson, I. M., McHutchison, J. G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A. M., Reddy, K. R., Bzowej, N. H., Marcellin, P., Muir, A. J., Ferenci, P. & other authors. (2011).** Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **364**, 2405–2416.
- Jain, S. K., Pemberton, P. W., Smith, A., McMahon, R. F., Burrows, P. C., Aboutwerat, A. & Warnes, T. W. (2001).** Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *Journal of Hepatology* **36**, 805–811.
- Jambunathan, S., Yin, J., Khan, W., Tamori, Y. & Puri, V. (2011).** FSP27 promotes lipid droplet clustering and then fusion to regulate triglyceride accumulation. *PLoS ONE* **6**, e28614.
- Janssen, H. L. A., Reesink, H. W., Lawitz, E. J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A. J., Patick, A. K., Chen, A. & other authors. (2012).** Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* **368**, 1685–1694.
- Jeffers, T. K. (1978).** *Eimeria tenella*: sensitivity of recent field isolants to Monensin. *Avian Dis* **22**, 157–161.
- Ji, H., Fraser, C. S., Yu, Y., Leary, J. & Doudna, J. A. (2004).** Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 16990–16995.
- Jiang, J., Cun, W., Wu, X., Shi, Q., Tang, H. & Luo, G. (2012).** Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* **86**, 7256–7267.
- Jiang, J., Wu, X., Tang, H. & Luo, G. (2013).** Apolipoprotein E mediates attachment of clinical hepatitis C virus to hepatocytes by binding to cell surface heparan sulfate proteoglycan receptors. *PLoS ONE* **8**, e67982.
- Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J. Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F. & Bartenschlager, R. (2010).** Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog* **6**, e1001233.
- Jo, J., Bengsch, B., Seigel, B., Rau, S. J., Schmidt, J., Bisse, E., Aichele, P., Aichele, U., Joeckel, L. & other authors. (2012).** Low perforin expression of early differentiated HCV-specific CD8⁺ T cells limits their hepatotoxic potential. *Journal of Hepatology* **57**, 9–16.
- Johnson, D. C. & Schlesinger, M. J. (1980).** Vesicular stomatitis virus and sindbis virus glycoprotein transport to the cell surface is inhibited by ionophores. *Virology* **103**, 407–424.
- Jolly, C., Kashefi, K., Hollinshead, M. & Sattentau, Q. J. (2004).** HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med* **199**, 283–293.
- Jolly, C. & Sattentau, Q. J. (2007).** Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *Journal of Virology* **81**, 7873–7884.
- Jones, C. T., Catanese, M. T., Law, L. M. J., Khetani, S. R., Syder, A. J., Ploss, A., Oh, T.**

- S., Schoggins, J. W., MacDonald, M. R. & other authors. (2010).** Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system. *Nat Biotechnol* **28**, 167–171.
- Jones, D. M., Patel, A. H., Targett-Adams, P. & McLauchlan, J. (2009).** The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. *Journal of Virology* **83**, 2163–2177.
- Jopling, C. L. (2005).** Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science* **309**, 1577–1581.
- Jopling, C. L. (2008).** Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochemical Society transactions* **36**, 1220–1223.

K

- Kalinina, O., Norder, H., Mukomolov, S. & Magnius, L. O. (2002).** A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *Journal of Virology* **76**, 4034–4043.
- Kamiya, N., Iwao, E., Hiraga, N., Tsuge, M., Imamura, M., Takahashi, S., Miyoshi, S., Tatenno, C., Yoshizato, K. & Chayama, K. (2010).** Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A protease inhibitor. *Journal of General Virology* **91**, 1668–1677.
- Kanda, T., Steele, R., Ray, R. & 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.
- Kanetaka, K., Sakamoto, M., Yamamoto, Y., Yamasaki, S., LANZA, F., Kanematsu, T. & Hirohashi, S. (2001).** Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* **35**, 637–642.
- Kanne, R. & Zähler, H. (1976).** Comparative studies on intracellular potassium- and sodium concentrations of wild-type and a macrotetrolide negative mutant of *Streptomyces griseus*. *Z Naturforsch, C, Biosci* **31**, 115–117.
- Kapadia, S. B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J. A. & Chisari, F. V. (2007).** Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *Journal of Virology* **81**, 374–383.
- Karagouni, E., Athanassopoulou, F., Tsagozis, P., Ralli, E., Moustakareas, T., Lytra, K. & Dotsika, E. (2005).** The impact of a successful anti-myxosporean treatment on the phagocyte functions of juvenile and adult *Sparus aurata* L. *Int J Immunopathol Pharmacol* **18**, 121–132.
- Karamatic Crew, V. (2004).** CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood* **104**, 2217–2223.
- Karmochkine, M., Carrat, F., Santos, Dos, O., Cacoub, P. & Raguin, G. (2006).** A case-control study of risk factors for hepatitis C infection in patients with unexplained routes of infection. *J Viral Hepat* **13**, 775–782.
- Karuppanan, A. K., Wu, K. X., Qiang, J., Chu, J. J.-H. & Kwang, J. (2012).** Natural compounds inhibiting the replication of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Antiviral Res* **94**, 188–194.
- Kasproicz, V., Schulze Zur Wiesch, J., Kuntzen, T., Nolan, B. E., Longworth, S., Berical, A., Blum, J., McMahon, C., Reyor, L. L. & other authors. (2008).** High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ and CD4+ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome. *J Virol* **82**, 3154–3160.

- Kaul, A., Woerz, I., Meuleman, P., Leroux-Roels, G. & Bartenschlager, R. (2007).** Cell Culture Adaptation of Hepatitis C Virus and In Vivo Viability of an Adapted Variant. *Journal of Virology* **81**, 13168–13179.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lopez, M. Z., Lohmann, V. & other authors. (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–e1000546.
- Kaul, R., Rowland-Jones, S. L., Kimani, J., Dong, T., Yang, H. B., Kiama, P., Rostron, T., Njagi, E., Bwayo, J. J. & other authors. (2001).** Late seroconversion in HIV-resistant Nairobi prostitutes despite pre-existing HIV-specific CD8+ responses. *J Clin Invest* **107**, 341–349.
- Kawada, M., Sumi, S., Umezawa, K., Inouye, S., Sawa, T. & Seto, H. (1992).** Circumvention of multidrug resistance in human carcinoma KB cells by polyether antibiotics. *J Antibiot* **45**, 556–562.
- Kawada, M. & Umezawa, K. (1991).** Long-lasting Accumulation of Vinblastine in Inostamycin-treated Multidrug-resistant KB Cells. *Japanese Journal of Cancer Research* **82**, 1160–1164.
- Kazarov, A. R. (2002).** An extracellular site on tetraspanin CD151 determines alpha3 and alpha6 integrin-dependent cellular morphology. *The Journal of Cell Biology* **158**, 1299–1309.
- Keller-Juslén, C., King, H. D., Kuhn, M., Loosli, H.-R. & Wartburg, A. V. (1978).** Noboritomycins A and B, new polyether antibiotics. *J Antibiot* **31**, 820–828.
- Kennedy, P. T. F., Urbani, S., Moses, R. A., Amadei, B., Fisicaro, P., Lloyd, J., Maini, M. K., Dusheiko, G., Ferrari, C. & Bertolotti, A. (2006).** The influence of T cell cross-reactivity on HCV-peptide specific human T cell response. *Hepatology* **43**, 602–611.
- Ketola, K., Hilvo, M., Hyötyläinen, T., Vuoristo, A., Ruskeepää, A.-L., Orešič, M., Kallioniemi, O. & Iljin, K. (2012).** Salinomycin inhibits prostate cancer growth and migration via induction of oxidative stress. *Br J Cancer* **106**, 99–106.
- Ketola, K., Vainio, P., Fey, V., Kallioniemi, O. & Iljin, K. (2010).** Monensin is a potent inducer of oxidative stress and inhibitor of androgen signaling leading to apoptosis in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* **9**, 3175–3185.
- Khakoo, S. I., Thio, C. L., Martin, M. P., Brooks, C. R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J. J., Vlahov, D. & other authors. (2004).** HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* **305**, 872–874.
- Khan, A. G., Whidby, J., Miller, M. T., Scarborough, H., Zatorski, A. V., Cygan, A., Price, A. A., Yost, S. A., Bohannon, C. D. & other authors. (2014).** Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature* **509**, 381–384.
- Khurana, S., Kremmentsov, D. N., de Parseval, A., Elder, J. H., Foti, M. & Thali, M. (2007).** Human immunodeficiency virus type 1 and influenza virus exit via different membrane microdomains. *Journal of Virology* **81**, 12630–12640.
- Kieft, J. S., Zhou, K., Jubin, R. & Doudna, J. A. (2001).** Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* **7**, 194–206.
- Kieft, J. S., Zhou, K., Grech, A., Jubin, R. & Doudna, J. A. (2002).** Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nat Struct Biol* **9**, 370–374.
- Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M. D., Landro, J. A., Chambers, S. P., Markland, W., Lepre, C. A. & other authors. (1996).** Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor

- peptide. *Cell* **87**, 343–355.
- Kim, S.-J., Kim, J.-H., Kim, Y.-G., Lim, H.-S. & Oh, J.-W. (2004).** Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* **279**, 50031–50041.
- Kim, W. K., Kim, J.-H., Yoon, K., Kim, S., Ro, J., Kang, H. S. & Yoon, S. (2012).** Salinomycin, a p-glycoprotein inhibitor, sensitizes radiation-treated cancer cells by increasing DNA damage and inducing G2 arrest. *Invest New Drugs* **30**, 1311–1318.
- Kimura, T., Saito, T., Yoshimura, M., Yixuan, S., Baba, M., Ji, G., Muramatsu, M. & Kawata, S. (2006).** Association of Transforming Growth Factor- β 1 Functional Polymorphisms with Natural Clearance of Hepatitis C Virus. *J Infect Dis* **193**(10), 1371–1374.
- Klade, C. S., Wedemeyer, H., Berg, T., Hinrichsen, H., Cholewinska, G., Zeuzem, S., Blum, H., Buschle, M., Jelovcan, S. & other authors. (2008).** Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. *Gastroenterology* **134**, 1385–1395.
- Klenk, H. D., Garten, W. & Rott, R. (1984).** Inhibition of proteolytic cleavage of the hemagglutinin of influenza virus by the calcium-specific ionophore A23187. *EMBO J* **3**, 2911–2915.
- Knapp, S., Yee, L. J., Frodsham, A. J., Hennig, B. J. W., Hellier, S., Zhang, L., Wright, M., Chiaramonte, M., Graves, M. & other authors. (2003).** Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes Immun* **4**, 411–419.
- Knapp, S., Warshow, U., Hegazy, D., Brackenbury, L., Guha, I. N., Fowell, A., Little, A.-M., Alexander, G. J., Rosenberg, W. M. C. & other authors. (2010).** Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus. *Hepatology* **51**, 1168–1175.
- Knapp, S., Warshow, U., Ho, K. M. A., Hegazy, D., Little, A.-M., Fowell, A., Alexander, G., Thursz, M., Cramp, M. & Khakoo, S. I. (2011).** A polymorphism in IL28B distinguishes exposed, uninfected individuals from spontaneous resolvers of HCV infection. *Gastroenterology* **141**, 320–322.
- Kneteman, N. M., Howe, A. Y. M., Gao, T., Lewis, J., Pevear, D., Lund, G., Douglas, D., Mercer, D. F., Tyrrell, D. L. J. & other authors. (2009).** HCV796: A selective nonstructural protein 5B polymerase inhibitor with potent anti-hepatitis C virus activity in vitro, in mice with chimeric human livers, and in humans infected with hepatitis C virus. *Hepatology* **49**, 745–752.
- Knobeloch, K. P., Wright, M. D., Ochsenbein, A. F., Liesenfeld, O., Lohler, J., Zinkernagel, R. M., Horak, I. & Orinska, Z. (2000).** Targeted inactivation of the tetraspanin CD37 impairs T-cell-dependent B-cell response under suboptimal costimulatory conditions. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 5363–5369.
- Kobayashi, J., Inai, T. & Shibata, Y. (2002).** Formation of tight junction strands by expression of claudin-1 mutants in their ZO-1 binding site in MDCK cells. *Histochem Cell Biol* **117**, 29–39.
- Kohama, T., Fukuda, A. & Sugiura, A. (1986).** Effect of carboxylic ionophores on measles virus hemagglutinin protein. *Arch Virol* **89**, 213–223.
- Kohl, S., Giddings, I., Besch, D., Apfelstedt-Sylla, E., Zrenner, E. & Wissinger, B. (1998).** The role of the peripherin/RDS gene in retinal dystrophies. *Acta Anat (Basel)* **162**, 75–84.
- Kohli, A., Zhang, X., Yang, J., Russell, R. S., Donnelly, R. P., Sheikh, F., Sherman, A.,**

- Young, H., Imamichi, T. & other authors. (2012).** Distinct and overlapping genomic profiles and antiviral effects of Interferon- λ and - α on HCV-infected and noninfected hepatoma cells. *J Viral Hepat* **19**, 843–853.
- Kohlway, A., Pirakitikulr, N., Ding, S. C., Yang, F., Luo, D., Lindenbach, B. D. & Pyle, A. M. (2014).** The linker region of NS3 plays a critical role in the replication and infectivity of hepatitis C virus. *Journal of Virology* **88**, 10970–10974.
- Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (2000).** Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *Journal of Virology* **74**, 2046–2051.
- Kondili, L. A., Chionne, P., Costantino, A., Villano, U., Noce, Lo, C., Pannozzo, F., Mele, A., Giampaoli, S. & Rapisetta, M. (2002).** Infection rate and spontaneous seroreversion of anti-hepatitis C virus during the natural course of hepatitis C virus infection in the general population. *Gut* **50**, 693–696.
- Kondo, F. (1988).** In vitro lecithinase activity and sensitivity to 22 antimicrobial agents of *Clostridium perfringens* isolated from necrotic enteritis of broiler chickens. *Res Vet Sci* **45**, 337–340.
- Kong, L., Giang, E., Nieuwsma, T., Kadam, R. U., Cogburn, K. E., Hua, Y., Dai, X., Stanfield, R. L., Burton, D. R. & other authors. (2013).** Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science* **342**, 1090–1094.
- Koppel, E. A., van Gisbergen, K. P. J. M., Geijtenbeek, T. B. H. & van Kooyk, Y. (2005).** Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. *Cell Microbiol* **7**, 157–165.
- Korenaga, M., Hino, K., Katoh, Y., Yamaguchi, Y., Okuda, M., Yoshioka, K. & Okita, K. (2001).** A possible role of hypervariable region 1 quasispecies in escape of hepatitis C virus particles from neutralization. *J Viral Hepat* **8**, 331–340.
- Kotenko, S. V., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R. P. & Pestka, S. (2001).** Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem* **276**, 2725–2732.
- Kotenko, S. V., Krause, C. D., Izotova, L. S., Pollack, B. P., Wu, W. & Pestka, S. (1997).** Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J* **16**, 5894–5903.
- Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., Langer, J. A., Sheikh, F., Dickensheets, H. & Donnelly, R. P. (2003).** IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* **4**, 69–77.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. & Bartenschlager, R. (2006).** Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *Journal of Virology* **80**, 5308–5320.
- Kouyoumdjian, J. A., Morita, M. D. P. A., Sato, A. K. & Pissolatti, A. F. (2001).** Fatal rhabdomyolysis after acute sodium Monensin (Rumensin®) toxicity: case report. *Arq Neuro-Psiquiatr* **59**, 596–598.
- Kovalenko, O. V., Yang, X. H. & Hemler, M. E. (2007).** A Novel Cysteine Cross-linking Method Reveals a Direct Association between Claudin-1 and Tetraspanin CD9. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**, 1855–1867.
- König, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H.-H., Bhattacharyya, S., Alamares, J. G., Tscherne, D. M., Ortigoza, M. B. & other authors. (2010).** Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* **463**, 813–817.

- Kramer, R. & Ginsburg, H. (1991).** Calcium transport and compartment analysis of free and exchangeable calcium in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *J Protozool* **38**, 594–601.
- Krawczynski, K. & Bradley, D. W. (1989).** Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: identification of virus-associated antigen in experimentally infected cynomolgus macaques. *J Infect Dis* **159**, 1042–1049.
- Krämer, B., Körner, C., Kebschull, M., Glässner, A., Eisenhardt, M., Nischalke, H.-D., Alexander, M., Sauerbruch, T., Spengler, U. & Nattermann, J. (2012).** Natural killer p46^{High} expression defines a natural killer cell subset that is potentially involved in control of hepatitis C virus replication and modulation of liver fibrosis. *Hepatology* **56**, 1201–1213.
- Krementsov, D. N., Rassam, P., Margeat, E., Roy, N. H., Schneider-Schaulies, J., Milhiet, P.-E. & Thali, M. (2010).** HIV-1 assembly differentially alters dynamics and partitioning of tetraspanins and raft components. *Traffic* **11**, 1401–1414.
- Krementsov, D. N., Weng, J., Lambelé, M., Roy, N. H. & Thali, M. (2009).** Tetraspanins regulate cell-to-cell transmission of HIV-1. *Retrovirology* **6**, 64.
- Krey, T., d'Alayer, J., Kikuti, C. M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, I., Johansson, D. X., Tawar, R. G., Baron, B. & other authors. (2010).** The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog* **6**, e1000762–e1000762.
- Krieger, S. E., Zeisel, M. B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H. J., Schnober, E. K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C. & other authors. (2010).** Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* **51**, 1144–1157.
- Krungskrai, J. & Yuthavong, Y. (1983).** Enhanced Ca²⁺ uptake by mouse erythrocytes in malarial (*Plasmodium berghei*) infection. *Molecular and Biochemical Parasitology* **7**, 227–235.
- Kullander, K. & Klein, R. (2002).** Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 475–486.
- Kumar, A., Ray, U. & Das, S. (2013).** Human La protein interaction with GCAC near the initiator AUG enhances hepatitis C Virus RNA replication by promoting linkage between 5' and 3' untranslated regions. *J Virol* **87**, 6713–6726.
- Kwon, Y.-C., Kang, J.-I., Hwang, S. B. & Ahn, B.-Y. (2013).** The ribonuclease L-dependent antiviral roles of human 2',5'-oligoadenylate synthetase family members against hepatitis C virus. *FEBS Letters* **587**, 156–164.
- Kyriakis, S. C., Sarris, K., Kritas, S. K., Saoulidis, K., Tsinas, A. C. & Tsiloyiannis, V. K. (1995).** The effect of salinomycin on the control of *Clostridium perfringens* type-A infection in growing pigs. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B* **42**, 355–359.

L

- la Fuente, de, C., Goodman, Z. & Rice, C. M. (2013).** Genetic and functional characterization of the N-terminal region of the hepatitis C virus NS2 protein. *J Virol* **87**, 4130–4145.
- Lacek, K., Vercauteren, K., Grzyb, K., Naddeo, M., Verhoye, L., Słowikowski, M. P., Fafi-Kremer, S., Patel, A. H., Baumert, T. F. & other authors. (2012).** Novel human SR-BI antibodies prevent infection and dissemination of HCV in vitro and in humanized mice. *Journal of Hepatology* **57**, 17–23.
- Laidlaw, S. M. & Dustin, L. B. (2013).** Interferon lambda: opportunities, risks, and

- uncertainties in the fight against HCV. *Front Immunol* **5**, 545–545.
- Lambelé, M., Koppensteiner, H., Symeonides, M., Roy, N. H., Chan, J., Schindler, M. & Thali, M. (2015).** Vpu is the main determinant for tetraspanin downregulation in HIV-1 infected cells. *Journal of Virology*.
- Lambot, M., Fr tier, S., Op De Beeck, A., Quatannens, B., Lestavel, S., Clavey, V. & Dubuisson, J. (2002).** Reconstitution of hepatitis C virus envelope glycoproteins into liposomes as a surrogate model to study virus attachment. *J Biol Chem* **277**, 20625–20630.
- Lammerding, J., Kazarov, A. R., Huang, H., Lee, R. T. & Hemler, M. E. (2003).** Tetraspanin CD151 regulates $\alpha 6 \beta 1$ integrin adhesion strengthening. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 7616–7621.
- Lamy-Freund, M. T., Ferreira, V. F. & Schreier, S. (1985).** Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation. *J Antibiot* **38**, 753–757.
- Lanford, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M. E., Kauppinen, S. & Ørum, H. (2010).** Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **327**, 198–201.
- Langhans, B., Kupfer, B., Braunschweiger, I., Arndt, S., Schulte, W., Nischalke, H.-D., Nattermann, J., Oldenburg, J., Sauerbruch, T. & Spengler, U. (2010).** Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. *Journal of Hepatology* **54**, 859–865.
- Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C. & Phillips, J. H. (1998).** Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* **391**, 703–707.
- Lapalombella, R., Yeh, Y.-Y., Wang, L., Ramanunni, A., Rafiq, S., Jha, S., Staubli, J., Lucas, D. M., Mani, R. & other authors. (2012).** Tetraspanin CD37 directly mediates transduction of survival and apoptotic signals. *Cancer Cell* **21**, 694–708.
- Larsen, C., Pialoux, G., Salmon, D., Antona, D., Le Strat, Y., Piroth, L., Pol, S., Rosenthal, E., Neau, D. & other authors. (2008).** Prevalence of hepatitis C and hepatitis B infection in the HIV-infected population of France, 2004. *Euro Surveill* **13**.
- Lasfar, A., Lewis-Antes, A., Smirnov, S. V. & Anantha, S. (2006).** Characterization of the mouse IFN- λ ligand-receptor system: IFN- λ s exhibit antitumor activity against B16 melanoma. *Cancer Research* **66**(8), 4468–4477.
- Lattanzio, F. A. & Pressman, B. C. (1986).** Alterations in intracellular calcium activity and contractility of isolated perfused rabbit hearts by ionophores and adrenergic agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **139**, 816–821.
- Lau, L. M. (2004).** The tetraspanin superfamily member CD151 regulates outside-in integrin α IIb β 3 signaling and platelet function. *Blood* **104**, 2368–2375.
- Laukov, A., Baran, M. & Kala njuk, G. I. (1995).** The effect of salinomycin and lasalocid on laboratory cultures of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus gallinarum* strains. *Folia microbiologica* **40**(3), 271–273.
- Lavanchy, D. (2011).** Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* **17**, 107–115.
- Lavie, M., Sarrazin, S., Montserret, R., Descamps, V., Baumert, T. F., Duverlie, G., S ron, K., Penin, F. & Dubuisson, J. (2014).** Identification of conserved residues in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 that modulate virus dependence on CD81 and SRB1 entry factors. *Journal of Virology* **88**, 10584–10597.
- Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F.-L., Penin, F. & Pécheur, E.-I. (2006).** Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* **281**, 3909–3917.

- Lavillette, D., Pécheur, E.-I., Donot, P., Fresquet, J., Molle, J., Corbau, R., Dreux, M., Penin, F. & Cosset, F.-L. (2007).** Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *Journal of Virology* **81**, 8752–8765.
- Lavillette, D., Tarr, A. W., Voisset, C., Donot, P., Bartosch, B., Bain, C., Patel, A. H., Dubuisson, J., Ball, J. K. & Cosset, F.-L. (2005).** Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* **41**, 265–274.
- Lawitz, E., Mangia, A., Wyles, D., Rodriguez-Torres, M., Hassanein, T., Gordon, S. C., Schultz, M., Davis, M. N., Kayali, Z. & other authors. (2013).** Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med* **368**, 1878–1887.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M. & Boucheix, C. (2000).** Severely Reduced Female Fertility in CD9-Deficient Mice. *Science* **287**, 319–321.
- Le Naour, F., André, M., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2006a).** Membrane microdomains and proteomics: Lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics* **6**, 6447–6454.
- Le Naour, F., André, M., Greco, C., Billard, M., Sordat, B., EMILE, J.-F., LANZA, F., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (2006b).** Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol Cell Proteomics* **5**, 845–857.
- Lean, I. J., Curtis, M., Dyson, R. & Lowe, B. (1994).** Effects of sodium Monensin on reproductive performance of dairy cattle. I. Effects on conception rates, calving-to-conception intervals, calving-to-heat and milk production in dairy cows. *Aust Vet J* **71**, 273–277.
- Lee, H.-C., Narayanan, S., Park, S.-J., Seong, S.-Y. & Hahn, Y. S. (2014a).** Transcriptional regulation of IFN- λ genes in hepatitis C virus-infected hepatocytes via IRF-3·IRF-7·NF- κ B complex. *J Biol Chem* **289**, 5310–5319.
- Lee, J. Y., Acosta, E. G., Stoeck, I. K., Long, G., Hiet, M.-S., Mueller, B., Fackler, O. T., Kallis, S. & Bartenschlager, R. (2014b).** Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins. *Journal of Virology* **88**, 12422–12437.
- Lee, S. R., Kardos, K. W., Schiff, E., Berne, C. A., Mounzer, K., Banks, A. T., Tatum, H. A., Friel, T. J., Demicco, M. P. & other authors. (2011).** Evaluation of a new, rapid test for detecting HCV infection, suitable for use with blood or oral fluid. *J Virol Methods* **172**, 27–31.
- Lefèvre, M., Felmlee, D. J., Parnot, M., Baumert, T. F. & Schuster, C. (2014).** Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E. *PLoS ONE* **9**, e95550.
- Leida, M. N., Mahoney, J. R. & Eaton, J. W. (1981).** Intraerythrocytic plasmodial calcium metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **103**, 402–406.
- Leitao, R. & Rodriguez, A. (2010).** Inhibition of Plasmodium sporozoites infection by targeting the host cell. *Exp Parasitol* **126**, 273–277.
- Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F. & Weber, P. C. (1999).** Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* **6**, 937–943.
- Li, G., Dziuba, N., Friedrich, B., Murray, J. L. & Ferguson, M. R. (2011).** A post-entry role for CD63 in early HIV-1 replication. *Virology* **412**, 315–324.
- Li, G., Endsley, M. A., Somasunderam, A., Gbota, S. L., Mbaka, M. I., Murray, J. L. & Ferguson, M. R. (2014).** The dual role of tetraspanin CD63 in HIV-1 replication.

Virology **11**, 23.

- Li, H.-F., Huang, C.-H., Ai, L.-S., Chuang, C.-K. & Chen, S. S. L. (2009).** Mutagenesis of the fusion peptide-like domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein: involvement in cell fusion and virus entry. *J Biomed Sci* **16**, 89.
- Li, J., Hu, S., Zhou, L., Ye, L., Wang, X., Ho, J. & Ho, W. (2010).** Interferon lambda inhibits herpes simplex virus type I infection of human astrocytes and neurons. *Glia* **59**, 58–67.
- Li, J. Z. & Li, P. (2007).** Cide proteins and the development of obesity. *Novartis Found Symp* **286**, 155–9– discussion 159–63– 196–203.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C. M., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M. & Lemon, S. M. (2005a).** Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 2992–2997.
- Li, Q., Pène, V., Krishnamurthy, S., Cha, H. & Liang, T. J. (2013a).** Hepatitis C virus infection activates an innate pathway involving IKK- α in lipogenesis and viral assembly. *Nat Med* **19**, 722–729.
- Li, X.-D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G. & Chen, Z. J. (2005b).** Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17717–17722.
- Li, X., Jiang, H., Qu, L., Yao, W., Cai, H., Chen, L. & Peng, T. (2013b).** Hepatocyte nuclear factor 4 α and downstream secreted phospholipase A2 GXIIB regulate production of infectious hepatitis C virus. *Journal of Virology* **88**, 612–627.
- Li, Y.-P., Ramirez, S., Gottwein, J. M., Scheel, T. K. H., Mikkelsen, L., Purcell, R. H. & Bukh, J. (2012).** Robust full-length hepatitis C virus genotype 2a and 2b infectious cultures using mutations identified by a systematic approach applicable to patient strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E1101–E1110.
- Liffers, S.-T., Tilkorn, D. J., Stricker, I., Junge, C. G., Al-Benna, S., Vogt, M., Verdoodt, B., Steinau, H.-U., Tannapfel, A. & other authors. (2013).** Salinomycin increases chemosensitivity to the effects of doxorubicin in soft tissue sarcomas. *BMC Cancer* **13**, 490.
- Lin, C., Lindenbach, B. D., Prágai, B. M., McCourt, D. W. & Rice, C. M. (1994).** Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *Journal of Virology* **68**, 5063–5073.
- Lindenbach, B. D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A. J., McKeating, J. A., Lanford, R. E., Feinstone, S. M., Major, M. E. & other authors. (2006).** Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 3805–3809.
- Lindenbach, B. D., Prágai, B. M., Montserret, R., Beran, R. K. F., Pyle, A. M., Penin, F. & Rice, C. M. (2007).** The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *Journal of Virology* **81**, 8905–8918.
- Lindern, von, J. J., Rojo, D., Grovit-Ferbas, K., Yeramian, C., Deng, C., Herbein, G., Ferguson, M. R., Pappas, T. C., Decker, J. M. & other authors. (2003).** Potential Role for CD63 in CCR5-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Macrophages. *Journal of Virology* **77**, 3624–3633.
- Lindsay, D. S. & Dubey, J. P. (1989).** Evaluation of anti-coccidial drugs' inhibition of *Neospora caninum* development in cell cultures. *J Parasitol* **75**, 990–992.
- Lindsay, K. L., Trepo, C., Heintges, T., Shiffman, M. L., Gordon, S. C., Hoefs, J. C.,**

- Schiff, E. R., Goodman, Z. D., Laughlin, M. & other authors. (2001).** A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* **34**, 395–403.
- Lineberry, N., Su, L., Soares, L. & Fathman, C. G. (2008).** The single-subunit transmembrane E3 ligase GRAIL captures and then ubiquitinates transmembrane proteins across the cell membrane. *Journal of Biological Chemistry* **283**(42), 28497–28505.
- Linton, K. J., Cooper, H. N., Hunter, I. S. & Leadlay, P. F. (1994).** An ABC-transporter from *Streptomyces longisporoflavus* confers resistance to the polyether-ionophore antibiotic tetronasin. *Mol Microbiol* **11**, 777–785.
- Lio, D., Licastro, F., Scola, L., Chiappelli, M., Grimaldi, L. M., Crivello, A., Colonna-Romano, G., Candore, G., Franceschi, C. & Caruso, C. (2003).** Interleukin-10 promoter polymorphism in sporadic Alzheimer's disease. *Genes Immun* **4**, 234–238.
- Lipskoch, M., Wiese, M., Timm, J., Roggendorf, M. & Viazov, S. (2014).** Genetic heterogeneity of hepatitis C virus cell entry receptors seems to have no influence on selection of virus variants. *Virology* **11**, 50.
- Liu, L., He, B., Liu, W. M., Zhou, D., Cox, J. V. & Zhang, X. A. (2007).** Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking. *J Biol Chem* **282**, 31631–31642.
- Liu, S., Kuo, W., Yang, W., Liu, W., Gibson, G. A., Dorko, K., Watkins, S. C., Strom, S. C. & Wang, T. (2010).** The second extracellular loop dictates Occludin-mediated HCV entry. *Virology* **407**, 160–170.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B. & Wang, T. (2009a).** Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* **83**, 2011–2014.
- Liu, Z., Tian, Y., Machida, K., Lai, M. M. C., Luo, G., Fong, S. K. H. & Ou, J.-H. J. (2012).** Transient activation of the PI3K-AKT pathway by hepatitis C virus to enhance viral entry. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 41922–41930.
- Liu, Z., Yang, F., Robotham, J. M. & Tang, H. (2009b).** Critical role of cyclophilin A and its prolyl-peptidyl isomerase activity in the structure and function of the hepatitis C virus replication complex. *Journal of Virology* **83**, 6554–6565.
- LJ, H., HG, E. & SV, G. (1981).** Toxic effects of lasalocid in horses. *Am J Vet Res* **42**, 456–461.
- Locker, N., Easton, L. E. & Lukavsky, P. J. (2007).** HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *EMBO J* **26**, 795–805.
- Loffler, S., Lottspeich, F., Lanza, F., Azorsa, D. O., Meulen, ter, V. & Schneider-Schaulies, J. (1997).** CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *Journal of Virology* **71**, 42–49.
- Logvinoff, C., Major, M. E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S. M., Alter, H., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2004).** Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 10149–10154.
- Lohmann, V., Körner, F., Herian, U. & Bartenschlager, R. (1997).** Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *Journal of Virology* **71**, 8416–8428.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999).** Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110–113.

- Lohmann, V., Roos, A., Körner, F., Koch, J. O. & Bartenschlager, R. (1998).** Biochemical and kinetic analyses of NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Virology* **249**, 108–118.
- Lohmann, V. (2012).** Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**, 167–198.
- Lohmann, V. & Bartenschlager, R. (2014).** On the History of Hepatitis C Virus Cell Culture Systems. *J Med Chem* **57**, 1627–1642.
- Long, E. (1998).** Regulation of Immune Responses by Inhibitory Receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **452**, 19–28.
- Long, P. L., Millard, B. J. & Smith, K. M. (1979).** The effect of some anticoccidial drugs on the development of immunity to coccidiosis in field and laboratory conditions. *Avian Pathol* **8**, 453–467.
- Lorenz, I. C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T. G. & Rice, C. M. (2006).** Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**, 831–835.
- Love, R. A., Parge, H. E., Wickersham, J. A., Hostomsky, Z., Habuka, N., Moomaw, E. W., Adachi, T. & Hostomska, Z. (1996).** The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* **87**, 331–342.
- Lozach, P.-Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Fong, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O. & other authors. (2003).** DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* **278**, 20358–20366.
- Ludlow, M., Rennick, L. J., Nambulli, S., de Swart, R. L. & Duprex, W. P. (2014).** Using the ferret model to study morbillivirus entry, spread, transmission and cross-species infection. *Curr Opin Virol* **4**, 15–23.
- Ludwig, I. S., Lekkerkerker, A. N., Depla, E., Bosman, F., Musters, R. J. P., Depraetere, S., van Kooyk, Y. & Geijtenbeek, T. B. H. (2004).** Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. *Journal of Virology* **78**, 8322–8332.
- Luik, P., Chew, C., Aittoniemi, J., Chang, J., Wentworth, P., Dwek, R. A., Biggin, P. C., Vénien-Bryan, C. & Zitzmann, N. (2009).** The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 12712–12716.
- Lukavsky, P. J., Otto, G. A., Lancaster, A. M., Sarnow, P. & Puglisi, J. D. (2000).** Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nat Struct Biol* **7**, 1105–1110.
- Lukavsky, P. J., Kim, I., Otto, G. A. & Puglisi, J. D. (2003).** Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nat Struct Biol* **10**, 1033–1038.
- Lundin, M., Monné, M., Widell, A., Heijne, Von, G. & Persson, M. A. A. (2003).** Topology of the Membrane-Associated Hepatitis C Virus Protein NS4B. *Journal of Virology* **77**, 5428–5438.
- Lupberger, J., Zeisel, M. B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C. J., Turek, M. & other authors. (2011).** EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* **17**, 589–595.
- Lutz, W. K., Wipf, H. K. & Simon, H. (1970).** Alkalikationen-Spezifität und Träger-Eigenschaften der Antibiotica Nigericin und Monensin. *Helvetica Chimica Acta* **53**(7), 1741–1746.
- Lynch, G. A., Hunt, M. E. & McCutcheon, S. N. (1990).** A note on the effect of Monensin

sodium administered by intraruminal controlled-release devices on productivity of dairy cows at pasture. *Animal Production* **51**(2), 418-421.

M

- Ma, H.-C., Lin, T.-W., Li, H., Iguchi-Ariga, S. M. M., Ariga, H., Chuang, Y.-L., Ou, J.-H. & Lo, S.-Y. (2008a).** Hepatitis C virus ARFP/F protein interacts with cellular MM-1 protein and enhances the gene trans-activation activity of c-Myc. *J Biomed Sci* **15**, 417–425.
- Ma, Y., Anantpadma, M., Timpe, J. M., Shanmugam, S., Singh, S. M., Lemon, S. M. & Yi, M. (2011).** Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J Virol* **85**, 86–97.
- Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S. M. & Yi, M. (2008b).** NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *Journal of Virology* **82**, 7624–7639.
- Machado, M. V., Oliveira, A. G. & Cortez-Pinto, H. (2011).** Hepatic steatosis in hepatitis B virus infected patients: meta-analysis of risk factors and comparison with hepatitis C infected patients. *J Gastroenterol Hepatol* **26**, 1361–1367.
- MacParland, S. A., Pham, T. N. Q., Gujar, S. A. & Michalak, T. I. (2006).** De novo infection and propagation of wild-type Hepatitis C virus in human T lymphocytes in vitro. *J Gen Virol* **87**, 3577–3586.
- Maecker, H. T. & Levy, S. (1997).** Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. *J Exp Med* **185**, 1505–1510.
- Mahmoudi, N. & Garcia-Domenech, R. (2008).** New active drugs against liver stages of Plasmodium predicted by molecular topology. *Antimicrobial agents chemotherapy* **52**(4), 1215-1220.
- Maillard, P., Huby, T., Andréo, U., Moreau, M., Chapman, J. & Budkowska, A. (2006).** The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB J* **20**, 735–737.
- Major, M. E., Mihalik, K., Fernandez, J., Seidman, J., Kleiner, D., Kolykhalov, A. A., Rice, C. M. & Feinstone, S. M. (1999).** Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. *Journal of Virology* **73**, 3317–3325.
- Mandel, L. J., Eisenberg, E. S., Simkin, N. J. & Miller, M. H. (1983).** Effect of N, N'-dicyclohexylcarbodiimide and nigericin on Staphylococcus aureus susceptibility to gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* **24**, 440–442.
- Mangia, A., Gentile, R., Cascavilla, I., Margaglione, M., Villani, M. R., Stella, F., Modola, G., Agostiano, V., Gaudiano, C. & Andriulli, A. (1999).** HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. *Journal of Hepatology* **30**, 984–989.
- Marcello, T., Grakoui, A., Barba-Spaeth, G., Machlin, E. S., Kotenko, S. V., MacDonald, M. R. & Rice, C. M. (2006).** Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* **131**, 1887–1898.
- Marsh, M., Wellsted, J., Kern, H., Harms, E. & Helenius, A. (1982).** Monensin inhibits Semliki Forest virus penetration into culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 5297–5301.
- Marsh, S. G. E., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D. E., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C. & other authors. (2003).** Killer-cell

- immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens* **62**(1), 79-86.
- Martel, A., Devriese, L. A., Cauwerts, K., De Gussem, K., Decostere, A. & Haesebrouck, F. (2004).** Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol* **33**, 3-7.
- Martin, C., Nielsen, S. U., Ibrahim, S., Bassendine, M. F. & Toms, G. L. (2008).** Binding of liver derived, low density hepatitis C virus to human hepatoma cells. *J Med Virol* **80**, 816-823.
- Martin, D. N. & Uprichard, S. L. (2013).** Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 10777-10782.
- Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T. & Shimotohno, K. (1999).** Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *Journal of Virology* **73**, 4713-4720.
- Marzouk, D., Sass, J., Bakr, I., Hosseiny, El, M., Abdel-Hamid, M., Rekacewicz, C., Chaturvedi, N., Mohamed, M. K. & Fontanet, A. (2007).** Metabolic and cardiovascular risk profiles and hepatitis C virus infection in rural Egypt. *Gut* **56**, 1105-1110.
- Mas Marques, A., Mueller, T., Welke, J., Taube, S., Sarrazin, C., Wiese, M., Halangk, J., Witt, H., Ahlenstiel, G. & other authors. (2009).** Low-density lipoprotein receptor variants are associated with spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *Infection, Genetics and Evolution* **9**, 847-852.
- Masaki, T., Matsunaga, S., Takahashi, H., Nakashima, K., Kimura, Y., Ito, M., Matsuda, M., Murayama, A., Kato, T. & other authors. (2014).** Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I- α in infectious virus production. *Journal of Virology* **88**, 7541-7555.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T. & other authors. (2008).** Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* **82**, 7964-7976.
- Masciopinto, F., Campagnoli, S., Abrignani, S., Uematsu, Y. & Pileri, P. (2000).** The small extracellular loop of CD81 is necessary for optimal surface expression of the large loop, a putative HCV receptor. *Virus Res* **80**, 1-10.
- Matsuda, M., Suzuki, R., Kataoka, C., Watashi, K., Aizaki, H., Kato, N., Matsuura, Y., Suzuki, T. & Wakita, T. (2014).** Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *Journal of General Virology* **95**, 2658-2667.
- Matsumoto, M., Hwang, S. B., Jeng, K. S., Zhu, N. & Lai, M. M. (1996).** Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* **218**, 43-51.
- Matsuura, Y., Tani, H., Suzuki, K., Kimura-Someya, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Ishii, K., Moriishi, K., Robison, C. S. & other authors. (2001).** Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* **286**, 263-275.
- Maurin, G., Fresquet, J., Granio, O. & Wychowski, C. (2011).** Identification of interactions in the E1E2 heterodimer of hepatitis C virus important for cell entry. *J Biol Chem* **286**(27), 23865-23876.
- Mazurov, D., Heidecker, G. & Derse, D. (2006).** HTLV-1 Gag protein associates with CD82 tetraspanin microdomains at the plasma membrane. *Virology* **346**, 194-204.
- McCaffrey, K., Boo, I., Tewierek, K., Edmunds, M. L., Pountourios, P. & Drummer, H. E. (2012).** Role of conserved cysteine residues in hepatitis C virus glycoprotein e2 folding and function. *J Virol* **86**, 3961-3974.

- McCaffrey, K., Gouklani, H., Boo, I., Poubourios, P. & Drummer, H. E. (2011).** The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *Journal of General Virology* **92**, 112–121.
- McColm, A. A. & McHardy, N. (1984).** Evaluation of a range of antimicrobial agents against the parasitic protozoa, *Plasmodium falciparum*, *Babesia rodhaini* and *Theileria parva* in vitro. *Ann Trop Med Parasitol* **78**, 345–354.
- McDonald, V., Stables, R., Warhurst, D. C., Barer, M. R., Blewett, D. A., Chapman, H. D., Connolly, G. M., Chiodini, P. L. & McAdam, K. P. (1990).** In vitro cultivation of *Cryptosporidium parvum* and screening for anticryptosporidial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 1498–1500.
- McFarland, A. P., Horner, S. M., Jarret, A., Joslyn, R. C., Bindewald, E., Shapiro, B. A., Delker, D. A., Hagedorn, C. H., Carrington, M. & other authors. (2011).** The favorable IFNL3 genotype escapes mRNA decay mediated by AU-rich elements and hepatitis C virus-induced microRNAs. *Nat Immunol* **15**, 72–79.
- McGivern, D. R., Masaki, T., Williford, S., Ingravallo, P., Feng, Z., Lahser, F., Asante-Appiah, E., Neddermann, P., De Francesco, R. & other authors. (2014).** Kinetic analyses reveal potent and early blockade of hepatitis C virus assembly by NS5A inhibitors. *Gastroenterology* **147**, 453–4e7.
- McHutchison, J. G., Gordon, S. C. & Schiff, E. R. (1998).** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* **339**(21), 1485–1492.
- McKiernan, S. M., Hagan, R., Curry, M., McDonald, G. S. A., Kelly, A., Nolan, N., Walsh, A., Hegarty, J., Lawlor, E. & Kelleher, D. (2004).** Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology* **40**, 108–114.
- McKiernan, S. M., Hagan, R., Curry, M., McDonald, G. S. A., Nolan, N., Crowley, J., Hegarty, J., Lawlor, E. & Kelleher, D. (2000).** The MHC is a major determinant of viral status, but not fibrotic stage, in individuals infected with hepatitis C. *Gastroenterology* **118**, 1124–1130.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B. (2002).** Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* **21**, 3980–3988.
- Mee, C. J., Farquhar, M. J., Harris, H. J., Hu, K., Ramma, W., Ahmed, A., Maurel, P., Bicknell, R., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2010).** Hepatitis C virus infection reduces hepatocellular polarity in a vascular endothelial growth factor-dependent manner. *Gastroenterology* **138**, 1134–1142.
- Mee, C. J., Grove, J., Harris, H. J., Hu, K., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2008).** Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry. *J Virol* **82**, 461–470.
- Mee, C. J., Harris, H. J., Farquhar, M. J., Wilson, G., Reynolds, G., Davis, C., van Ijzendoorn, S. C. D., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2009).** Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J Virol* **83**, 6211–6221.
- Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F.-L. & Dragic, T. (2008).** The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *Journal of Virology* **82**, 3555–3560.
- Meertens, L., Bertaux, C. & Dragic, T. (2006).** Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *Journal of Virology* **80**, 11571–11578.
- Mehlhorn, H., Pooch, H. & Raether, W. (1983).** The action of polyether ionophorous

- antibiotics (Monensin, salinomycin, lasalocid) on developmental stages of *Eimeria tenella* (Coccidia, Sporozoa) in vivo and in vitro: Study by light and electron microscopy. *Z Parasitenkd* **69**, 457–471–471.
- Mehra, N. K. & Kaur, G. (2003)**. MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. *Expert Rev Mol Med* **5**(7), 1-17.
- Mehta, D. (2006)**. Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiological Reviews* **86**, 279–367.
- Meier, U.-C., Owen, R. E., Taylor, E., Worth, A., Naoumov, N., Willberg, C., Tang, K., Newton, P., Pellegrino, P. & other authors. (2005)**. Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *Journal of Virology* **79**, 12365–12374.
- Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A. & other authors. (2001)**. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* **7**, 927–933.
- Meredith, L. W., Zitzmann, N. & McKeating, J. A. (2013)**. Differential effect of p7 inhibitors on hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *Antiviral Res* **100**, 636–639.
- Metz, P., Dazert, E., Ruggieri, A., Mazur, J., Kaderali, L., Kaul, A., Zeuge, U., Windisch, M. P., Trippler, M. & other authors. (2012)**. Identification of type I and type II interferon-induced effectors controlling hepatitis C virus replication. *Hepatology* **56**, 2082–2093.
- Meuleman, P., Catanese, M. T., Verhoye, L., Desombere, I., Farhoudi, A., Jones, C. T., Sheahan, T., Grzyb, K., Cortese, R. & other authors. (2012)**. A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology* **55**, 364–372.
- Meuleman, P., Hesselgesser, J., Paulson, M., Vanwolleghem, T., Desombere, I., Reiser, H. & Leroux-Roels, G. (2008)**. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* **48**, 1761–1768.
- Meunier, J.-C., Engle, R. E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S. U., Cosset, F.-L., Purcell, R. H. & Bukh, J. (2005)**. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 4560–4565.
- Meunier, J.-C., Russell, R. S., Engle, R. E., Faulk, K. N., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (2008)**. Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus. *J Virol* **82**, 9647–9656.
- Meyer, M. F., Lehmann, M., Cornberg, M., Wiegand, J., Manns, M. P., Klade, C. & Wedemeyer, H. (2007)**. Clearance of low levels of HCV viremia in the absence of a strong adaptive immune response. *Virology* **4**, 58.
- Meyer-Olson, D., Shoukry, N. H., Brady, K. W., Kim, H., Olson, D. P., Hartman, K., Shintani, A. K., Walker, C. M. & Kalams, S. A. (2004)**. Limited T cell receptor diversity of HCV-specific T cell responses is associated with CTL escape. *J Exp Med* **200**, 307–319.
- Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J. C., Ung, S., Rice, C. M. & Dubuisson, J. (1997)**. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* **78** (Pt 9), 2299–2306.
- Michta, M. L., Hopcraft, S. E., Narbus, C. M., Kratovac, Z., Israelow, B., Sourisseau, M. & Evans, M. J. (2010)**. Species-specific regions of occludin required by hepatitis C virus for cell entry. *J Virol* **84**, 11696–11708.
- Midez, J. A., Hopfer, R. L., Lopez-Berestein, G. & Mehta, R. T. (1989)**. Effects of free and liposomal amphotericin B and gramicidin S alone and in combination on potassium leakage from human erythrocytes and *Candida albicans*. *Antimicrob*

- Agents Chemother* **33**, 152–155.
- Min, G. (2006).** Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-Å resolution. *The Journal of Cell Biology* **173**, 975–983.
- Minton, E. J., Smillie, D., Neal, K. R., Irving, W. L., Underwood, J. C. & James, V. (1998).** Association between MHC class II alleles and clearance of circulating hepatitis C virus. Members of the Trent Hepatitis C Virus Study Group. *J Infect Dis* **178**, 39–44.
- Mirandola, S., Bowman, D., Hussain, M. M. & Alberti, A. (2009).** Hepatic steatosis in hepatitis C is a storage disease due to HCV interaction with microsomal triglyceride transfer protein (MTP). *Nutr Metab (Lond)* **7**, 13–13.
- Miura, Y., Kainuma, M., Jiang, H., Velasco, H., Vogt, P. K. & Hakomori, S. (2004).** Reversion of the Jun-induced oncogenic phenotype by enhanced synthesis of sialosylceramide (GM3 ganglioside). *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 16204–16209.
- Miyazari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. & Shimotohno, K. (2007).** The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* **9**, 1089–1097.
- Mizukoshi, E., Eisenbach, C., Edlin, B. R., Newton, K. P., Raghuraman, S., Weiler-Normann, C., Tobler, L. H., Busch, M. P., Carrington, M. & other authors. (2008).** Hepatitis C virus (HCV)-specific immune responses of long-term injection drug users frequently exposed to HCV. *J Infect Dis* **198**, 203–212.
- Molnár, K. & Ostoros, G. (2007).** Efficacy of some anticoccidial drugs for treating coccidial enteritis of the common carp caused by *Goussia carpelli* (Apicomplexa: Eimeriidae). *Acta Vet Hung* **55**, 67–76.
- Monazahian, M., Böhme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S. & Thomssen, R. (1999).** Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* **57**, 223–229.
- Montpellier, C., Tews, B. A., Poitrimole, J., Rocha-Perugini, V., D'Arienzo, V., Potel, J., Zhang, X. A., Rubinstein, E., Dubuisson, J. & Cocquerel, L. (2011).** Interacting regions of CD81 and two of its partners, EWI-2 and EWI-2wint, and their effect on hepatitis C virus infection. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 13954–13965.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H. E., Bartenschlager, R., Penin, F. & Lohmann, V. (2004).** Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology* **78**, 13278–13284.
- Moradpour, D., Brass, V. & Penin, F. (2005).** Function follows form: the structure of the N-terminal domain of HCV NS5A. *Hepatology* **42**, 732–735.
- Morello, V., Cabodi, S., Sigismund, S., Camacho-Leal, M. P., Repetto, D., Volante, M., Papotti, M., Turco, E. & Defilippi, P. (2011).** β 1 integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells. *Oncogene* **30**, 4087–4096.
- Moretta, A., Vitale, M., Sivori, S., Bottino, C., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Pende, D., Ciccone, E. & other authors. (1994).** Human natural killer cell receptors for HLA-class I molecules. Evidence that the Kp43 (CD94) molecule functions as receptor for HLA-B alleles. *J Exp Med* **180**, 545–555.
- Moretta, L., Bottino, C., Cantoni, C., Mingari, M. C. & Moretta, A. (2001).** Human natural killer cell function and receptors. *Curr Opin Pharmacol* **1**, 387–391.
- Morikawa, K., Zhao, Z., Date, T., Miyamoto, M., Murayama, A., Akazawa, D., Tanabe,**

- J., Sone, S. & Wakita, T. (2007).** The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol* **79**, 714–723.
- Morin, T. J., Broering, T. J., Leav, B. A., Blair, B. M., Rowley, K. J., Boucher, E. N., Wang, Y., Cheslock, P. S., Knauber, M. & other authors. (2011).** Human monoclonal antibody HCV1 effectively prevents and treats HCV infection in chimpanzees. *PLoS Pathog* **8**, e1002895–e1002895.
- Morishima, C., Paschal, D. M., Wang, C. C., Yoshihara, C. S., Wood, B. L., Yeo, A. E. T., Emerson, S. S., Shuhart, M. C. & Gretch, D. R. (2006).** Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatology* **43**, 573–580.
- Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T. & Koike, K. (1998).** The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* **4**, 1065–1067.
- Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T. & Koike, K. (1997).** Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* **78** (Pt 7), 1527–1531.
- Morrow, C. M. K., Mruk, D., Cheng, C. Y. & Hess, R. A. (2010).** Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **365**, 1679–1696.
- Morrow, M. P., Pankhong, P., Laddy, D. J., Schoenly, K. A., Yan, J., Cisper, N. & Weiner, D. B. (2009).** Comparative ability of IL-12 and IL-28B to regulate Treg populations and enhance adaptive cellular immunity. *Blood* **113**, 5868–5877.
- Moscato, G. A., Giannelli, G., Grandi, B., Pieri, D., Marsi, O., Guarducci, I., Batini, I., Altomare, E., Antonaci, S. & other authors. (2011).** Quantitative determination of hepatitis C core antigen in therapy monitoring for chronic hepatitis C. *Intervirology* **54**, 61–65.
- Mulkey, R. M. & Zucker, R. S. (1992).** Monensin can transport calcium across cell membranes in a sodium independent fashion in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Neurosci Lett* **143**, 115–118.
- Murayama, Y., Shinomura, Y., Oritani, K., Miyagawa, J.-I., Yoshida, H., Nishida, M., Katsube, F., Shiraga, M., Miyazaki, T. & other authors. (2008).** The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells. *J Cell Physiol* **216**, 135–143.
- Murphy, E. L., Bryzman, S. M., Glynn, S. A., Ameti, D. I., Thomson, R. A., Williams, A. E., Nass, C. C., Ownby, H. E., Schreiber, G. B. & other authors. (2000).** Risk factors for hepatitis C virus infection in United States blood donors. NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS). *Hepatology* **31**, 756–762.
- Myskiw, C., Piper, J., Huzarewich, R., Booth, T. F., Cao, J. & He, R. (2010).** Nigericin is a potent inhibitor of the early stage of vaccinia virus replication. *Antiviral Res* **88**, 304–310.

N

- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. & Sato, J. (1982).** Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**, 3858–3863.
- Nakajima, N., Hijikata, M., Yoshikura, H. & Shimizu, Y. K. (1996).** Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. *Journal of Virology* **70**, 3325–3329.

- Nakamura, M., Kunimoto, S., Takahashi, Y., Naganawa, H., Sakaue, M., Inoue, S., Ohno, T. & Takeuchi, T. (1992).** Inhibitory effects of polyethers on human immunodeficiency virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 492–494.
- Nakazato, K. & Hatano, Y. (1991).** Monensin-mediated antiport of Na⁺ and H⁺ across liposome membrane. *Biochim Biophys Acta* **1064**, 103–110.
- Narbus, C. M., Israelow, B., Sourisseau, M., Michta, M. L., Hopcraft, S. E., Zeiner, G. M. & Evans, M. J. (2011).** HepG2 cells expressing microRNA miR-122 support the entire hepatitis C virus life cycle. *Journal of Virology* **85**, 12087–12092.
- Nassar-Gentina, V., Rojas, E. & Luxoro, M. (1994).** Rise in cytoplasmic Ca²⁺ induced by Monensin in bovine medullary chromaffin cells. *Cell Calcium* **16**, 475–480.
- Nattermann, J., Nischalke, H.-D., Hofmeister, V., Ahlenstiel, G., Zimmermann, H., Leifeld, L., Weiss, E. H., Sauerbruch, T. & Spengler, U. (2005).** The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. *Am J Pathol* **166**, 443–453.
- Nebbia, C., Ceppa, L., Dacasto, M., Carletti, M. & Nachtmann, C. (1999).** Oxidative metabolism of Monensin in rat liver microsomes and interactions with tiamulin and other chemotherapeutic agents: evidence for the involvement of cytochrome P-450 3A subfamily. *Drug Metab Dispos* **27**, 1039–1044.
- Neddermann, P., Quintavalle, M., Di Pietro, C., Clementi, A., Cerretani, M., Altamura, S., Bartholomew, L. & De Francesco, R. (2004).** Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *Journal of Virology* **78**, 13306–13314.
- Negash, A. A., Ramos, H. J., Crochet, N., Lau, D. T. Y., Doehle, B., Papic, N., Delker, D. A., Jo, J., Bertoletti, A. & other authors. (2012).** IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathog* **9**, e1003330–e1003330.
- Negro, F. (2014).** Hepatitis C in 2013: HCV causes systemic disorders that can be cured. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**, 77–78.
- Netski, D. M., Mosbrugger, T., Depla, E., Maertens, G., Ray, S. C., Hamilton, R. G., Roundtree, S., Thomas, D. L., McKeating, J. & Cox, A. (2005).** Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* **41**, 667–675.
- Neveu, B., Debeaupuis, E., Echasserieau, K., le Moullac-Vaidye, B., Gassin, M., Jegou, L., Decalf, J., Albert, M., Ferry, N. & other authors. (2008).** Selection of high-avidity CD8 T cells correlates with control of hepatitis C virus infection. *Hepatology* **48**, 713–722.
- Nielsen, S. U., Bassendine, M. F., Burt, A. D., Martin, C., Pumeechockchai, W. & Toms, G. L. (2006).** Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *Journal of Virology* **80**, 2418–2428.
- Nolandt, O., Kern, V., Müller, H., Pfaff, E., Theilmann, L., Welker, R. & Kräusslich, H. G. (1997).** Analysis of hepatitis C virus core protein interaction domains. *J Gen Virol* **78** (Pt 6), 1331–1340.
- Novilla, M. N., Owen, N. V. & Todd, G. C. (1994).** The comparative toxicology of narasin in laboratory animals. *Vet Hum Toxicol* **36**, 318–323.
- Nuckols, J. T., McAuley, A. J., Huang, Y.-J. S., Horne, K. M., Higgs, S., Davey, R. A. & Vanlandingham, D. L. (2014).** pH-Dependent entry of chikungunya virus fusion into mosquito cells. *Virol J* **11**, e11479.

- O'Brien, T. R., Prokunina-Olsson, L. & Donnelly, R. P. (2014).** IFN- λ 4: the paradoxical new member of the interferon lambda family. *J Interferon Cytokine Res* **34**, 829–838.
- Odintsova, E. (2003).** Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *Journal of Cell Science* **116**, 4557–4566.
- Odintsova, E., Sugiura, T. & Berditchevski, F. (2000).** Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol* **10**, 1009–1012.
- Odintsova, E., Butters, T. D., Monti, E., Sprong, H., van Meer, G. & Berditchevski, F. (2006).** Gangliosides play an important role in the organization of CD82-enriched microdomains. *Biochem J* **400**, 315.
- Ohara, E., Hiraga, N., Imamura, M., Iwao, E., Kamiya, N., Yamada, I., Kono, T., Onishi, M., Hirata, D. & other authors. (2011).** Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *Journal of Hepatology* **54**, 872–878.
- Ohnami, N., Nakamura, A., Miyado, M., Sato, M., Kawano, N., Yoshida, K., Harada, Y., Takezawa, Y., Kanai, S. & other authors. (2012).** CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biol Open* **1**, 640–647.
- Okamoto, K., Kinoshita, H., Parquet, M. D. C., Raekiansyah, M., Kimura, D., Yui, K., Islam, M. A., Hasebe, F. & Morita, K. (2012).** Dengue virus strain DEN2 16681 utilizes a specific glycochain of syndecan-2 proteoglycan as a receptor. *Journal of General Virology* **93**, 761–770.
- Olaby, Al, R. R., Cocquerel, L., Zemla, A., Saas, L., Dubuisson, J., Vielmetter, J., Marcotrigiano, J., Khan, A. G., Catalan, F. V. & other authors. (2014).** Identification of a novel drug lead that inhibits HCV infection and cell-to-cell transmission by targeting the HCV E2 glycoprotein. *PLoS ONE* **9**, e111333.
- Oliviero, B., Varchetta, S., Paudice, E., Michelone, G., Zaramella, M., Mavilio, D., De Filippi, F., Bruno, S. & Mondelli, M. U. (2009).** Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* **137**, 1151–1157.
- Olsen, D. B., Davies, M.-E., Handt, L., Koeplinger, K., Zhang, N. R., Ludmerer, S. W., Graham, D., Liverton, N., MacCoss, M. & other authors. (2011).** Sustained viral response in a hepatitis C virus-infected chimpanzee via a combination of direct-acting antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 937–939.
- Oniangue-Ndza, C., Kuntzen, T., Kemper, M., Berical, A., Wang, Y. E., Neumann-Haefelin, C., Foote, P. K., Hills-Evans, K., Reyor, L. L. & other authors. (2011).** Compensatory mutations restore the replication defects caused by cytotoxic T lymphocyte escape mutations in hepatitis C virus polymerase. *Journal of Virology* **85**, 11883–11890.
- Onishi, E., Natori, K. & Yamazaki, S. (1991).** The antiviral effect of phorbol ester and calcium ionophore A23187 is not mediated by interferons. *J Interferon Res* **11**, 171–175.
- Ono, M., Handa, K., Sonnino, S., Withers, D. A., Nagai, H. & Hakomori, S.-I. (2001).** GM3 Ganglioside Inhibits CD9-Facilitated Haptotactic Cell Motility: Coexpression of GM3 and CD9 Is Essential in the Downregulation of Tumor Cell Motility and Malignancy †. *Biochemistry* **40**, 6414–6421.
- Op De Beeck, A., Voisset, C., Bartosch, B., Ciczora, Y., Cocquerel, L., Keck, Z., Fong,**

- S., Cosset, F.-L. & Dubuisson, J. (2004).** Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Journal of Virology* **78**, 2994–3002.
- Orentas, R. J. & Hildreth, J. E. (1993).** Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 1157–1165.
- Orland, J. R., Wright, T. L. & Cooper, S. (2001).** Acute hepatitis C. *Hepatology* **33**, 321–327.
- Ouyang, E. C., Wu, C. H., Walton, C., Promrat, K. & Wu, G. Y. (2001).** Transplantation of human hepatocytes into tolerized genetically immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* **7**, 324–330.
- Ovchinnikov, Y. A., Ivanov, V. T., Evstratov, A. V., Mikhaleva, I. I., Bystrov, V. F., Portnova, S. L., Balashova, T. A., Meshcheryakova, E. N. & Tulchinsky, V. M. (1974).** The enniatin ionophores. Conformation and ion binding properties. *Int J Pept Protein Res* **6**, 465–498.
- Ovchinnikov, Y. A., Ivanov, V. T., Evstratov, A. V., Bystrov, V. F., Abdullaev, N. D., Popov, E. M., Lipkind, G. M., Arkhipova, S. F., Efremov, E. S. & Shemyakin, M. M. (1969).** The physicochemical basis of the functioning of biological membranes: Dynamic conformational properties of enniatin B and its K⁺ complex in solution. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **37**, 668–676.
- Owen, D. M., Huang, H., Ye, J. & Gale, M. (2009).** Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* **394**, 99–108.
- Owsianka, A., Clayton, R. F., Loomis-Price, L. D., McKeating, J. A. & Patel, A. H. (2001).** Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *J Gen Virol* **82**, 1877–1883.

p

- Paeshuyse, J., Dallmeier, K. & Neyts, J. (2011).** Ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus infection: a review of the proposed mechanisms of action. *Curr Opin Virol* **1**, 590–598.
- Pallaoro, M., Lahm, A., Biasiol, G., Brunetti, M., Nardella, C., Orsatti, L., Bonelli, F., Orrù, S., Narjes, F. & Steinkühler, C. (2001).** Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *Journal of Virology* **75**, 9939–9946.
- Pancaldi, S., Bruni, A., Dall'Olio, G. & Fasulo, M. P. (1994).** Interaction of Monensin on dimorphic transition and hyphal growth in *Candida albicans*. *Microbios* **79**, 163–170.
- Pang, P. S., Jankowsky, E., Planet, P. J. & Pyle, A. M. (2002).** The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J* **21**, 1168–1176.
- Parent, R., Qu, X., PETIT, M.-A. & 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. N., Lee, J. M., Lee, D. & Kim, B. S. (2008).** Antifungal activity of valinomycin, a peptide antibiotic produced by *Streptomyces* sp. Strain M10 antagonistic to *Botrytis cinerea*. *J Microbiol Biotechnol* **18**, 880–884.
- Park, J. H., Park, S., Yang, J.-S., Kwon, O. S., Kim, S. & Jang, S. K. (2013).** Discovery of cellular proteins required for the early steps of HCV infection using integrative

- genomics. *PLoS ONE* **8**, e60333.
- Park, W. H., Jung, C. W., Park, J. O., Kim, K., Kim, W. S., Im, Y. H., Lee, M. H., Kang, W. K. & Park, K. (2003).** Monensin inhibits the growth of renal cell carcinoma cells via cell cycle arrest or apoptosis. *Int J Oncol* **22**, 855–860.
- Park, Y., Lee, J.-H., Kim, B. S., Kim, D. Y., Han, K.-H. & Kim, H.-S. (2010).** New automated hepatitis C virus (HCV) core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification. *J Clin Microbiol* **48**, 2253–2256.
- Patton, J. B., Rowland, R. R., Yoo, D. & Chang, K.-O. (2009).** Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. *Virus Res* **140**, 161–171.
- Paul, D., Hoppe, S., Saher, G., Krijnse-Locker, J. & Bartenschlager, R. (2013).** Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *Journal of Virology* **87**, 10612–10627.
- Pavlović, D., Neville, D. C. A., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R. A., Fischer, W. B. & Zitzmann, N. (2003).** The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 6104–6108.
- Pawlotsky, J. M., Germanidis, G., Frainais, P. O., Bouvier, M., Soulier, A., Pellerin, M. & Dhumeaux, D. (1999).** Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy. *Journal of Virology* **73**, 6490–6499.
- Pawlotsky, J.-M. (2013).** NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *Journal of Hepatology* **59**, 375–382.
- Pawlotsky, J.-M. (2014).** New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology* **146**, 1176–1192.
- Pelchen-Matthews, A. (2003).** Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *The Journal of Cell Biology* **162**, 443–455.
- Pelletier, S., Drouin, C., Bédard, N., Khakoo, S. I., Bruneau, J. & Shoukry, N. H. (2010).** Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *Journal of Hepatology* **53**, 805–816.
- Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H. E., Bartenschlager, R. & Moradpour, D. (2004).** Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* **279**, 40835–40843.
- Penna, A., Pilli, M., Zerbini, A., Orlandini, A., Mezzadri, S., Sacchelli, L., Missale, G. & Ferrari, C. (2007).** Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **45**, 588–601.
- Perz, J. F., Armstrong, G. L., Farrington, L. A., Hutin, Y. J. F. & Bell, B. P. (2006).** The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of Hepatology* **45**, 529–538.
- Pestka, J. M., Zeisel, M. B., Bläser, E., Schürmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Patel, A. H., Meisel, H., Baumert, J. & other authors. (2007).** Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 6025–6030.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J. & Hellen, C. U. (1997).** A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* **12**, 67–83.

- Pfeiffer, D. R., Reed, P. W. & Lardy, H. A. (1974).** Ultraviolet and fluorescent spectral properties of the divalent cation ionophore A23187 and its metal ion complexes. *Biochemistry* **13**, 4007–4014.
- Phan, T., Kohlway, A., Dimberu, P., Pyle, A. M. & Lindenbach, B. D. (2011).** The acidic domain of hepatitis C virus NS4A contributes to RNA replication and virus particle assembly. *Journal of Virology* **85**, 1193–1204.
- Piasecki, B. A., Lewis, J. D., Rajender Reddy, K., Bellamy, S. L., Porter, S. B., Weinrieb, R. M., Stieritz, D. D. & Chang, K.-M. (2004).** Influence of alcohol use, race, and viral coinfections on spontaneous HCV clearance in a US veteran population. *Hepatology* **40**, 892–899.
- Picard-Maureau, M., Jarmy, G., Berg, A., Rethwilm, A. & Lindemann, D. (2003).** Foamy virus envelope glycoprotein-mediated entry involves a pH-dependent fusion process. *Journal of Virology* **77**, 4722–4730.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D. & Bartenschlager, R. (2002).** Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *Journal of Virology* **76**, 4008–4021.
- Pileri, P. (1998).** Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* **282**, 938–941.
- Pinkerton, M., Steinrauf, L. K. & Dawkins, P. (1969).** The molecular structure and some transport properties of valinomycin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **35**, 512–518.
- Piñero, D. & Martinez-Salas, E. (2012).** RNA structural elements of hepatitis C virus controlling viral RNA translation and the implications for viral pathogenesis. *Viruses* **4**, 2233–2250.
- Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S. L., Zuleger, N., Piehl, C., Wiesner, B., Krause, G. & Blasig, I. E. (2008).** Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J* **22**, 146–158.
- Pique, C., Lagaudrière-Gesbert, C., Delamarre, L., Rosenberg, A. R., Conjeaud, H. & Dokhlar, M.-C. (2000).** Interaction of CD82 Tetraspanin Proteins with HTLV-1 Envelope Glycoproteins Inhibits Cell-to-Cell Fusion and Virus Transmission. *Virology* **276**, 455–465.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P. & Rice, C. M. (2009).** Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882–886.
- Podevin, P., Carpentier, A., Pène, V., Aoudjehane, L., Carrière, M., Zaïdi, S., Hernandez, C., Calle, V., Méritet, J.-F. & other authors. (2010).** Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* **139**, 1355–1364.
- Pols, M. S. & Klumperman, J. (2009).** Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* **315**, 1584–1592.
- Polyak, S. J., McArdle, S., Liu, S. L., Sullivan, D. G., Chung, M., Hofgärtner, W. T., Carithers, R. L., McMahon, B. J., Mullins, J. I. & other authors. (1998).** Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *Journal of Virology* **72**, 4288–4296.
- Pomper, G. J., Wu, Y. Y. & Snyder, E. L. (2003).** Risks of transfusion-transmitted infections: 2003. *Current opinion in hematology* **10**(5), 412–418.
- Poordad, F., McCone, J., Bacon, B. R., Bruno, S., Manns, M. P., Sulkowski, M. S., Jacobson, I. M., Reddy, K. R., Goodman, Z. D. & other authors. (2011).** Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **364**, 1195–1206.

- Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Héliot, L. & other authors. (2011).** NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* **7**, e1001278.
- Popescu, C.-I. & Dubuisson, J. (2009).** Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol Cell* **102**, 63–74.
- Popescu, C.-I., Riva, L., Vlaicu, O., Farhat, R., Rouillé, Y. & Dubuisson, J. (2014).** Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology (Basel)* **3**, 892–921.
- Potel, J. (2012).** Caractérisation d'inhibiteurs de l'entrée du Virus de l'Hépatite C.
- Potel, J., Rassam, P., Montpellier, C., Kaestner, L., Werkmeister, E., Tews, B. A., Couturier, C., Popescu, C.-I., Baumert, T. F. & other authors. (2013).** EWI-2wint promotes CD81 clustering that abrogates Hepatitis C Virus entry. *Cell Microbiol* **15**, 1234–1252.
- Poynard, T., Bedossa, P., Chevallier, M., Mathurin, P., Lemonnier, C., Trepo, C., Couzigou, P., Payen, J. L., Sajus, M. & other authors. (1995).** A Comparison of Three Interferon Alfa-2b Regimens for the Long-Term Treatment of Chronic Non-A, Non-B Hepatitis. *N Engl J Med* **332**, 1457–1463.
- Pöhlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G. J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R. W., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003).** Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *Journal of Virology* **77**, 4070–4080.
- Prentoe, J., Jensen, T. B., Meuleman, P., Serre, S. B. N., Scheel, T. K. H., Leroux-Roels, G., Gottwein, J. M. & Bukh, J. (2011).** Hypervariable region 1 differentially impacts viability of hepatitis C virus strains of genotypes 1 to 6 and impairs virus neutralization. *J Virol* **85**, 2224–2234.
- Prentoe, J., Serre, S. B. N., Ramirez, S., Nicosia, A., Gottwein, J. M. & Bukh, J. (2014).** Hypervariable region 1 deletion and required adaptive envelope mutations confer decreased dependency on scavenger receptor class B type I and low-density lipoprotein receptor for hepatitis C virus. *J Virol* **88**, 1725–1739.
- Pressman, B. C. (1976).** Biological applications of ionophores. *Annual review of biochemistry* **45**, 501-530.
- Prince, A. M., Brotman, B., Huima, T., Pascual, D., Jaffery, M. & Genevieve, I. (1992).** Immunity in Hepatitis C Infection. *Journal of Infectious Diseases* **165**, 438–443.
- Prokunina-Olsson, L., Muchmore, B., Tang, W., Pfeiffer, R. M., Park, H., Dickensheets, H., Hergott, D., Porter-Gill, P., Mummy, A. & other authors. (2013).** A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* **123**, 2082–2099.
- Pumeechockchai, W., Bevitt, D., Agarwal, K., Petropoulou, T., Langer, B. C. A., Belohradsky, B., Bassendine, M. F. & Toms, G. L. (2002).** Hepatitis C virus particles of different density in the blood of chronically infected immunocompetent and immunodeficient patients: Implications for virus clearance by antibody. *J Med Virol* **68**, 335–342.
- Purkait, B., Kumar, A., Nandi, N., Sardar, A. H., Das, S., Kumar, S., Pandey, K., Ravidas, V., Kumar, M. & other authors. (2012).** Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 1031–1041.

Q

- Qiu, Z., Tufaro, F. & Gillam, S. (1995).** Brefeldin A and Monensin arrest cell surface expression of membrane glycoproteins and release of rubella virus. *J Gen Virol* **76** (Pt 4), 855–863.
- Quintavalle, M., Sambucini, S., Summa, V., Orsatti, L., Talamo, F., De Francesco, R. & Neddermann, P. (2007).** Hepatitis C virus NS5A is a direct substrate of casein kinase I-alpha, a cellular kinase identified by inhibitor affinity chromatography using specific NS5A hyperphosphorylation inhibitors. *J Biol Chem* **282**, 5536–5544.

R

- Rajesh, S., Sridhar, P., Tews, B. A., Fénéant, L., Cocquerel, L., Ward, D. G., Berditchevski, F. & Overduin, M. (2012).** Structural basis of ligand interactions of the large extracellular domain of tetraspanin CD81. *J Virol* **86**, 9606–9616.
- Raleigh, D. R., Boe, D. M., Yu, D., Weber, C. R., Marchiando, A. M., Bradford, E. M., Wang, Y., Wu, L., Schneeberger, E. E. & other authors. (2011).** Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function. *The Journal of Cell Biology* **193**, 565–582.
- Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, F., Pan, Q., de Ruiter, P. E., Willemsen, R., Demmers, J. A. A., Raj, V. S. & other authors. (2013).** Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 13109–13113.
- Rana, S., Yue, S., Stadel, D. & Zoller, M. (2012).** Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **44**, 1574–1584.
- Ranjith-Kumar, C. T., Wen, Y., Baxter, N., Bhardwaj, K. & Cheng Kao, C. (2011).** A cell-based assay for RNA synthesis by the HCV polymerase reveals new insights on mechanism of polymerase inhibitors and modulation by NS5A. *PLoS ONE* **6**, e22575.
- Rauch, A., Kutalik, Z., Descombes, P., Cai, T., di Iulio, J., Mueller, T., Bochud, M., Battegay, M., Bernasconi, E. & other authors. (2010).** Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* **138**, 1338–1337.
- Ray, K. (2011).** Viral hepatitis: Promising phase I trial results for TG4040 vaccine in patients with chronic hepatitis C. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**, 420.
- Ray, R. B., Meyer, K., Steele, R., Shrivastava, A., Aggarwal, B. B. & Ray, R. (1998).** Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* **273**, 2256–2259.
- Razavi, H., Waked, I., Sarrazin, C., Myers, R. P., Idilman, R., Calinas, F., Vogel, W., Correa, M. C. M., Hézode, C. & other authors. (2014).** The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today's treatment paradigm. *J Viral Hepat* **21 Suppl 1**, 34–59.
- Real, L. M., Neukam, K., Herrero, R., Guardiola, J. M., Reiberger, T., Rivero-Juarez, A., Salazar, J., Mandorfer, M., Merino, D. & other authors. (2013).** IFNL4 ss469415590 variant shows similar performance to rs12979860 as predictor of response to treatment against Hepatitis C Virus genotype 1 or 4 in Caucasians. *PLoS ONE* **9**, e95515–e95515.
- Reed, P. W. & Lardy, H. A. (1972).** A23187: a divalent cation ionophore. *J Biol Chem* **247**, 6970–6977.
- Reid, W. M., Kowalski, L. & Rice, J. (1972).** Anticoccidial Activity of Monensin in Floor-Pen Experiments. *Poult Sci* **51**, 139–146.

- Reyes, G. R. (2002).** The nonstructural NS5A protein of hepatitis C virus: an expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis C virus pathogenesis. *J Biomed Sci* **9**, 187–197.
- Reynolds, G. M., Harris, H. J., Jennings, A., Hu, K., Grove, J., Lalor, P. F., Adams, D. H., Balfe, P., Hubscher, S. G. & McKeating, J. A. (2008).** Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology* **47**, 418–427.
- Riccioni, R., Dupuis, M. L., Bernabei, M., Petrucci, E., Pasquini, L., Mariani, G., Cianfriglia, M. & Testa, U. (2010).** The cancer stem cell selective inhibitor salinomycin is a p-glycoprotein inhibitor. *Blood Cells Mol Dis* **45**, 86–92.
- Richardson, L. F., Raun, A. P. & Potter, E. L. (1976).** Effect of Monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo [Cattle]. *Journal of Animal Science* **4**(3), 657–664.
- Ricketts, A. P. & Pfefferkorn, E. R. (1993).** Toxoplasma gondii: susceptibility and development of resistance to anticoccidial drugs in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 2358–2363.
- Robek, M. D., Boyd, B. S. & Chisari, F. V. (2005).** Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *Journal of Virology* **79**, 3851–3854.
- Roberts, A. P. E., Lewis, A. P. & Jopling, C. L. (2011).** miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res* **39**, 7716–7729.
- Roberts, E. A. & Yeung, L. (2002).** Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* **36**, S106–S113.
- Roccasecca, R., Ansuini, H., Vitelli, A., Meola, A., Scarselli, E., Acali, S., Pezzanera, M., Ercole, B. B., McKeating, J. & other authors. (2003).** Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *Journal of Virology* **77**, 1856–1867.
- Rocha, B. A., de Oliveira, A. R. M., Pazin, M., Dorta, D. J., Rodrigues, A. P. N., Berretta, A. A., Peti, A. P. F., de Moraes, L. A. B., Lopes, N. P. & other authors. (2014).** Jacobsen catalyst as a cytochrome P450 biomimetic model for the metabolism of Monensin A. *Biomed Res Int* **2014**, 152102.
- Rocha-Perugini, V., Lavie, M., Delgrange, D., Canton, J., Pillez, A., Potel, J., Lecoœur, C., Rubinstein, E., Dubuisson, J. & other authors. (2009).** The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry. *BMC Microbiol* **9**, 111.
- Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., Drobecq, H., LE NAOUR, F., Charrin, S. & other authors. (2008).** The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* **3**, e1866.
- Rodger, A. J., Roberts, S., Lanigan, A., Bowden, S., Brown, T. & Crofts, N. (2000).** Assessment of long-term outcomes of community-acquired hepatitis C infection in a cohort with sera stored from 1971 to 1975. *Hepatology* **32**, 582–587.
- Romero, V., Azocar, J., Zúñiga, J., Clavijo, O. P., Terreros, D., Gu, X., Husain, Z., Chung, R. T., Amos, C. & Yunis, E. J. (2008).** Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in Hepatitis C virus infection outcome. *Molecular Immunology* **45**, 2429–2436.
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J. Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S. & other authors. (2011).** Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* **8**, e1003056–e1003056.
- Romero-López, C. & Berzal-Herranz, A. (2009).** A long-range RNA-RNA interaction between the 5′ and 3′ ends of the HCV genome. *RNA* **15**, 1740–1752.

- Rosenquist, Å., Samuelsson, B., Johansson, P.-O., Cummings, M. D., Lenz, O., Raboisson, P., Simmen, K., Vendeville, S., de Kock, H. & other authors. (2014).** Discovery and development of simeprevir (TMC435), a HCV NS3/4A protease inhibitor. *J Med Chem* **57**, 1673–1693.
- Ross-Thriepland, D., Mankouri, J. & Harris, M. (2015).** Serine phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein controls the establishment of replication complexes. *J Virol* **89**(6), 3123-3135.
- Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A. H. & other authors. (2006).** Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology* **80**, 2832–2841.
- Rous, B. A., Reaves, B. J., Ihrke, G., Briggs, J. A. G., Gray, S. R., Stephens, D. J., Banting, G. & Luzio, J. P. (2002).** Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell* **13**, 1071–1082.
- Roussel, J., Pillez, A., Montpellier, C., Duverlie, G., Cahour, A., Dubuisson, J. & Wychowski, C. (2003).** Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *J Gen Virol* **84**, 1751–1759.
- Rubinstein, E., Ziyat, A., Prenant, M., Wrobel, E., Wolf, J.-P., Levy, S., LE NAOUR, F. & Boucheix, C. (2006).** Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Developmental Biology* **290**, 351–358.
- Russell, J. B. (1987).** A proposed mechanism of Monensin action in inhibiting ruminant bacterial growth: Effects on ion flux and protonmotive force. *J Anim Sci* **64**(5), 1519-1525.
- Russell, J. B. & Strobel, H. J. (1990).** ATPase-dependent energy spilling by the ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*. *Arch Microbiol* **153**, 378–383.
- Russell, R. S., Kawaguchi, K., Meunier, J. C., Takikawa, S., Faulk, K., Bukh, J., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (2009).** Mutational analysis of the hepatitis C virus E1 glycoprotein in retroviral pseudoparticles and cell-culture-derived H77/JFH1 chimeric infectious virus particles. *J Viral Hepat* **16**, 621–632.
- Russell, R. S., Meunier, J.-C., Takikawa, S., Faulk, K., Engle, R. E., Bukh, J., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. (2008).** Advantages of a single-cycle production assay to study cell culture-adaptive mutations of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 4370–4375.
- Ruzzi, L., Gagnoux-Palacios, L., Pinola, M., Belli, S., Meneguzzi, G., D'Alessio, M. & Zambruno, G. (1997).** A homozygous mutation in the integrin alpha6 gene in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Clin Invest* **99**, 2826–2831.
- Ryabova, I. D., Gorneva, G. A. & Ovchinnikov, Y. A. (1975).** Effect of valinomycin on ion transport in bacterial cells and on bacterial growth. *Biochim Biophys Acta* **401**, 109–118.
- Ryley, J. F. & Betts, M. J. (1973).** Chemotherapy of chicken coccidiosis. *Adv Pharmacol Chemother* **11**, 221-293.
- Ryoo, I.-J., Park, H.-R., Choo, S.-J., Hwang, J.-H., Park, Y.-M., Bae, K.-H., Shin-Ya, K. & Yoo, I.-D. (2006).** Selective cytotoxic activity of valinomycin against HT-29 Human colon carcinoma cells via down-regulation of GRP78. *Biol Pharm Bull* **29**, 817–820.

S

- Sachs, N., Claessen, N., Aten, J., Kreft, M., Teske, G. J. D., Koeman, A., Zuurbier, C. J., Janssen, H. & Sonnenberg, A. (2012).** Blood pressure influences end-stage renal

- disease of Cd151 knockout mice. *J Clin Invest* **122**, 348–358.
- Sadej, R., Grudowska, A., Turczyk, L., Kordek, R. & Romanska, H. M. (2014).** CD151 in cancer progression and metastasis: a complex scenario. *Lab Invest* **94**, 41–51.
- Sainz, B., Barretto, N., Martin, D. N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K. A., Yu, X., Chayama, K. & other authors. (2012).** Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* **18**, 281–285.
- Saito, T., Owen, D. M., Jiang, F., Marcotrigiano, J. & 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. & Bukh, J. (2003).** The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 11646–11651.
- Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y. & Tsukita, S. (1997).** Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* **137**, 1393–1401.
- Samji, T. (2009).** Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med* **82**, 153–159.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J. & other authors. (1996).** Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722–725.
- Sandrin, V., Boulanger, P., Penin, F., Granier, C., Cosset, F.-L. & Bartosch, B. (2005).** Assembly of functional hepatitis C virus glycoproteins on infectious pseudoparticles occurs intracellularly and requires concomitant incorporation of E1 and E2 glycoproteins. *J Gen Virol* **86**, 3189–3199.
- Santolini, E., Migliaccio, G. & La Monica, N. (1994).** Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *Journal of Virology* **68**, 3631–3641.
- Sanz Cameno, P., Martín Vilchez, S., Rodriguez Muñoz, Y. & Moreno-Otero, R. (2008).** Implication of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs) in hepatitis C virus. *Hepatology* **48**, 346–348.
- Sarhan, M. A., Chen, A. Y. & Michalak, T. I. (2013).** Differential expression of candidate virus receptors in human T lymphocytes prone or resistant to infection with patient-derived hepatitis C virus. *PLoS ONE* **8**, e62159.
- Sarhan, M. A., Pham, T. N. Q., Chen, A. Y. & Michalak, T. I. (2012).** Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5. *Journal of Virology* **86**, 3723–3735.
- Sasaki, H., Matsui, C., Furuse, K., Mimori-Kiyosue, Y., Furuse, M. & Tsukita, S. (2003).** Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 3971–3976.
- Sassman, S. A. & Lee, L. S. (2007).** Sorption and degradation in soils of veterinary ionophore antibiotics: Monensin and lasalocid. *Environ Toxicol Chem* **26**, 1614–1621.
- Sato, K., Aoki, J., Misawa, N., Daikoku, E., Sano, K., Tanaka, Y. & Koyanagi, Y. (2008).** Modulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity through Incorporation of Tetraspanin Proteins. *Journal of Virology* **82**, 1021–1033.
- Satoh, E. & Satoh, K. (2007).** Monensin causes transient calcium ion influx into mouse splenic lymphocytes in a sodium ion-independent fashion. *Eur J Pharmacol* **561**, 39–

- Satoh, S., Hirota, M., Noguchi, T., Hijikata, M., Handa, H. & Shimotohno, K. (2000).** Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* **270**, 476–487.
- Sauer, F. D., Kramer, J. K. & Cantwell, W. J. (1989).** Antiketogenic effects of Monensin in early lactation. *J Dairy Sci* **72**, 436–442.
- Sánchez-Felipe, L., Villar, E. & Muñoz-Barroso, I. (2014).** Entry of Newcastle Disease Virus into the host cell: role of acidic pH and endocytosis. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 300–309.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. & Vitelli, A. (2002).** The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* **21**, 5017–5025.
- Schaewen, von, M. & Ploss, A. (2014).** Murine models of hepatitis C: what can we look forward to? *Antiviral Res* **104**, 15–22.
- Scheel, T. K. H., Gottwein, J. M., Mikkelsen, L. S., Jensen, T. B. & Bukh, J. (2011).** Recombinant HCV variants with NS5A from genotypes 1-7 have different sensitivities to an NS5A inhibitor but not interferon- α . *Gastroenterology* **140**, 1032–1042.
- Scheel, T. K. H., Simmonds, P. & Kapoor, A. (2014).** Surveying the global virome: Identification and characterization of HCV-related animal hepaciviruses. *Antiviral Res* **115C**, 83–93.
- Scheffer, K. D., Berditchevski, F. & Florin, L. (2014).** The tetraspanin CD151 in papillomavirus infection. *Viruses* **6**, 893–908.
- Scheffer, K. D., Gawlitza, A., Spoden, G. A., Zhang, X. A., Lambert, C., Berditchevski, F. & Florin, L. (2013).** Tetraspanin CD151 mediates papillomavirus type 16 endocytosis. *Journal of Virology* **87**, 3435–3446.
- Schelling, G. T. (1984).** Monensin mode of action in the rumen. *J Anim Sci* **58**, 1518–1527.
- Schlaphoff, V., Klade, C. S., Jilma, B., Jelovcan, S. B., Cornberg, M., Tauber, E., Manns, M. P., Wedemeyer, H. IC41 Study Group. (2007).** Functional and phenotypic characterization of peptide-vaccine-induced HCV-specific CD8+ T cells in healthy individuals and chronic hepatitis C patients. *Vaccine* **25**, 6793–6806.
- Schlegel, R., Willingham, M. & Pastan, I. (1981).** Monensin blocks endocytosis of vesicular stomatitis virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **102**, 992–998.
- Schmid, E., Zurbriggen, A., Gassen, U., Rima, B., Meulen, ter, V. & Schneider-Schaulies, J. (2000).** Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibit canine distemper virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion. *Journal of Virology* **74**, 7554–7561.
- Schmidt-Mende, J., Bieck, E., Hugle, T., Penin, F., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2001).** Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **276**, 44052–44063.
- Scholtes, C., Ramière, C., Rainteau, D., Perrin-Cocon, L., Wolf, C., Humbert, L., Carreras, M., Guironnet-Paquet, A., Zoulim, F. & other authors. (2012).** High plasma level of nucleocapsid-free envelope glycoprotein-positive lipoproteins in hepatitis C patients. *Hepatology* **56**, 39–48.
- Schott, E., Witt, H., Neumann, K., Taube, S., Oh, D.-Y., Schreier, E., Vierich, S., Puhl, G., Bergk, A. & other authors. (2007).** A Toll-like receptor 7 single nucleotide

- polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. *Journal of Hepatology* **47**, 203–211.
- Schregel, V., Jacobi, S., Penin, F. & Tautz, N. (2009).** Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 5342–5347.
- Schulte, D., Vogel, M., Langhans, B., Krämer, B., Körner, C., Nischalke, H. D., Steinberg, V., Michalk, M., Berg, T., Rockstroh, J. K., Sauerbruch, T., Spengler, U. & Nattermann, J. (2009).** The HLA-ER/HLA-ER Genotype Affects the Natural Course of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and Is Associated with HLA-E-Restricted Recognition of an HCV-derived peptide by interferon-gamma-secreting human CD8(+) T cells. *J Infect Dis* **200**(9), 1397-1401.
- Scott, J. D., McMahon, B. J., Bruden, D., Sullivan, D., Homan, C., Christensen, C. & Gretch, D. R. (2006).** High rate of spontaneous negativity for hepatitis C virus RNA after establishment of chronic infection in Alaska Natives. *Clin Infect Dis* **42**, 945–952.
- Sebastià, N., Meca, G., Soriano, J. M. & Mañes, J. (2011).** Antibacterial effects of enniatins J1 and J3 on pathogenic and lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 2710–2717.
- Segond, D., Abi Khalil, E., Buisson, C., Daou, N., Kallassy, M., Lereclus, D., Arosio, P., Bou-Abdallah, F. & Nielsen Le Roux, C. (2014).** Iron acquisition in *Bacillus cereus*: the roles of IIsA and bacillibactin in exogenous ferritin iron mobilization. *PLoS Pathog* **10**, e1003935.
- Seigneuret, M. (2006).** Complete Predicted Three-Dimensional Structure of the Facilitator Transmembrane Protein and Hepatitis C Virus Receptor CD81: Conserved and Variable Structural Domains in the Tetraspanin Superfamily. *Biophysical Journal* **90**, 212–227.
- Seipp, S., Mueller, H. M., Pfaff, E., Stremmel, W., Theilmann, L. & Goeser, T. (1997).** Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro. *J Gen Virol* **78** (Pt 10), 2467–2476.
- Serebrov, V. & Pyle, A. M. (2004).** Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* **430**, 476–480.
- Serru, V., NAOUR, F. L., Billard, M., AZORSA, D. O., LANZA, F., Boucheix, C. & Rubinstein, E. (1999).** Selective tetraspan–integrin complexes (CD81/ α 4 β 1, CD151/ α 3 β 1, CD151/ α 6 β 1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem J* **340**, 103.
- Seshachalam, D., Frahm, D. H. & Ferraro, F. M. (1973).** Cation reversal of inhibition of growth by valinomycin in *Streptococcus pyogenes* and *Clostridium sporogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* **3**, 63–67.
- Shanmukhappa, K., Kim, J.-K. & Kapil, S. (2007).** Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virol J* **4**, 62.
- Sharma, N. R., Mateu, G., Dreux, M., Grakoui, A., Cosset, F.-L. & Melikyan, G. B. (2011).** Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 30361–30376.
- Shata, M. T., Tricoche, N., Perkus, M., Tom, D., Brotman, B., McCormack, P., Pfahler, W., Lee, D.-H., Tobler, L. H. & other authors. (2003).** Exposure to low infective doses of HCV induces cellular immune responses without consistently detectable viremia or seroconversion in chimpanzees. *Virology* **314**, 601–616.
- Shaw, M. L., Stone, K. L., Colangelo, C. M., Gulcicek, E. E. & Palese, P. (2008).** Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog* **4**, e1000085.

- Sheikh, F., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shah, N. K., Smirnov, S. V., Anantha, S., Dickensheets, H., Dumoutier, L., Renauld, J.-C. & other authors. (2004).** Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *J Immunol* **172**, 2006–2010.
- Shen, W.-J., Hu, J., Hu, Z., Kraemer, F. B. & Azhar, S. (2014).** Scavenger receptor class B type I (SR-BI): a versatile receptor with multiple functions and actions. *Metab Clin Exp* **63**, 875–886.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C. & other authors. (2003).** IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* **4**, 63–68.
- Shi, Q., Jiang, J. & Luo, G. (2013).** Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *J Virol* **87**, 6866–6875.
- Shi, W. (2000).** The Tetraspanin CD9 Associates with Transmembrane TGF- α and Regulates TGF- α -induced EGF Receptor Activation and Cell Proliferation. *The Journal of Cell Biology* **148**, 591–602.
- Shi, W., Freitas, I. T., Zhu, C., Zheng, W., Hall, W. W. & Higgins, D. G. (2012).** Recombination in hepatitis C virus: identification of four novel naturally occurring inter-subtype recombinants. *PLoS ONE* **7**, e41997.
- Shimakami, T., Yamane, D., Jangra, R. K., Kempf, B. J., Spaniel, C., Barton, D. J. & Lemon, S. M. (2012).** Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 941–946.
- Shin, C. G., An, D. G., Song, H. H. & Lee, C. (2009).** Beauvericin and enniatins H, I and MK1688 are new potent inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. *J Antibiot* **62**(12), 687-690.
- Shin, E.-C., Park, S. H., DeMinio, M., Nascimbeni, M., Mihalik, K., Major, M., Veerapu, N. S., Heller, T., Feinstone, S. M. & other authors. (2011).** Delayed Induction, Not Impaired Recruitment, of Specific CD8⁺ T Cells Causes the Late Onset of Acute Hepatitis C. *Gastroenterology* **141**, 686–695.e1.
- Shirley, M. W., Smith, A. L. & Tomley, F. M. (2005).** The biology of avian Eimeria with an emphasis on their control by vaccination. *Adv Parasitol* **60**, 285–330.
- Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K. & Murakami, S. (2002).** Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* **277**, 11149–11155.
- Shoukry, N. H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D. Y., Ghayeb, J., Reimann, K. A. & Walker, C. M. (2003).** Memory CD8⁺ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **197**, 1645–1655.
- Shrivastava, A., Manna, S. K., Ray, R. & Aggarwal, B. B. (1998).** Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *Journal of Virology* **72**, 9722–9728.
- Shumard, R. F. & Callender, M. E. (1967).** Monensin, a new biologically active compound. VI. Anticoccidial activity. *Antimicrob Agents Chemother* **7**, 369–377.
- Silva, R. O. S., Salvarani, F. M., Assis, R. A., Martins, N. R. S., Pires, P. S. & Lobato, F. C. F. (2009).** Antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens strains isolated from broiler chickens. *Braz J Microbiol* **40**, 262–264.
- Silvie, O. (2006).** Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *Journal of Cell Science* **119**, 1992–2002.
- Singethan, K. (2006).** CD9-dependent regulation of Canine distemper virus-induced

- cell-cell fusion segregates with the extracellular domain of the haemagglutinin. *Journal of General Virology* **87**, 1635–1642.
- Siraskar, B., Ballal, A., Bobbala, D., Föller, M. & Lang, F. (2010).** Effect of amphotericin B on parasitemia and survival of plasmodium berghei-infected mice. *Cell Physiol Biochem* **26**, 347–354.
- Smith, C. K. & Strout, R. G. (1979).** Eimeria tenella: accumulation and retention of anticoccidial ionophores by extracellular sporozoites. *Exp Parasitol* **48**, 325–330.
- Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T. & Simmonds, P. (2014).** Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* **59**, 318–327.
- Smyk-Pearson, S., Tester, I. A., Klarquist, J., Palmer, B. E., Pawlotsky, J.-M., Golden-Mason, L. & Rosen, H. R. (2008).** Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help. *J Virol* **82**, 1827–1837.
- Smyth, L. A., Ratnasothy, K., Tsang, J. Y. S., Boardman, D., Warley, A., Lechler, R. & Lombardi, G. (2013).** CD73 expression on extracellular vesicles derived from CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells contributes to their regulatory function. *Eur J Immunol* **43**, 2430–2440.
- Soldaini, E., Wack, A., D'Oro, U., Nuti, S., Olivieri, C., Baldari, C. T. & Abrignani, S. (2003).** T cell costimulation by the hepatitis C virus envelope protein E2 binding to CD81 is mediated by Lck. *Eur J Immunol* **33**, 455–464.
- Soler, M., Pellerin, M., Malnou, C. E., Dhumeaux, D., Kean, K. M. & Pawlotsky, J.-M. (2002).** Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5' noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* **298**, 160–173.
- Sommereyns, C., Paul, S., Staeheli, P. & Michiels, T. (2008).** IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog* **4**, e1000017–e1000017.
- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Jünemann, C., Bartenschlager, R. & Niepmann, M. (2006).** The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *Journal of Virology* **80**, 11579–11588.
- Sourisseau, M., Michta, M. L., Zony, C., Israelow, B., Hopcraft, S. E., Narbus, C. M., Parra Martín, A. & Evans, M. J. (2013).** Temporal analysis of hepatitis C virus cell entry with occludin directed blocking antibodies. *PLoS Pathog* **9**, e1003244.
- Spickard, A., Butler, W. T., Andriole, V. & Utz, J. P. (1963).** The improved prognosis of cryptococcal meningitis with amphotericin B therapy. *Ann Intern Med* **58**, 66–83.
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C. & Florin, L. (2007).** Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16-involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS ONE* **3**, e3313–e3313.
- Spoden, G., Kühling, L., Cordes, N., Frenzel, B., Sapp, M., Boller, K., Florin, L. & Schelhaas, M. (2013).** Human papillomavirus types 16, 18, and 31 share similar endocytic requirements for entry. *Journal of Virology* **87**, 7765–7773.
- Stamataki, Z., Shannon-Lowe, C., Shaw, J., Mutimer, D., Rickinson, A. B., Gordon, J., Adams, D. H., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2009).** Hepatitis C virus association with peripheral blood B lymphocytes potentiates viral infection of liver-derived hepatoma cells. *Blood* **113**, 585–593.

- Stapleford, K. A. & Lindenbach, B. D. (2011).** Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J Virol* **85**, 1706–1717.
- Steinman, R. M. & Hemmi, H. (2006).** Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **311**, 17–58.
- Steinmann, E., Brohm, C., Kallis, S., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2008).** Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles. *J Virol* **82**, 7034–7046.
- Steinmann, E., Doerrbecker, J., Friesland, M., Riebesehl, N., Ginkel, C., Hillung, J., Gentzsch, J., Lauber, C., Brown, R. & other authors. (2013).** Characterization of hepatitis C virus intra- and intergenotypic chimeras reveals a role of the glycoproteins in virus envelopment. *J Virol* **87**, 13297–13306.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A. H., Bartenschlager, R. & Pietschmann, T. (2007).** Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* **3**, e103.
- Steinmann, E. & Pietschmann, T. (2010).** Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* **2**, 2078–2095.
- Sterk, L. M., Geuijen, C. A., Oomen, L. C., Calafat, J., Janssen, H. & Sonnenberg, A. (2000).** The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol* **149**, 969–982.
- Steverding, D. & Sexton, D. W. (2013).** Trypanocidal activity of salinomycin is due to sodium influx followed by cell swelling. *Parasit Vectors* **6**, 78.
- StGelais, C., Foster, T. L., Verow, M., Atkins, E., Fishwick, C. W. G., Rowlands, D., Harris, M. & Griffin, S. (2009).** Determinants of hepatitis C virus p7 ion channel function and drug sensitivity identified in vitro. *J Virol* **83**, 7970–7981.
- Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V. & Hemler, M. E. (2001).** EWI-2 Is a Major CD9 and CD81 Partner and Member of a Novel Ig Protein Subfamily. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 40545–40554.
- Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V. & Hemler, M. E. (2003).** Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 106–112.
- Stone, A. E. L., Giugliano, S., Schnell, G., Cheng, L., Leahy, K. F., Golden-Mason, L., Gale, M. & Rosen, H. R. (2012).** Hepatitis C virus pathogen associated molecular pattern (PAMP) triggers production of lambda-interferons by human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog* **9**, e1003316–e1003316.
- Strong, R. K., Holmes, M. A., Li, P., Braun, L., Lee, N. & Geraghty, D. E. (2003).** HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. *J Biol Chem* **278**, 5082–5090.
- Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Supekova, L., Thimme, R., Wieland, S., Bukh, J., Purcell, R. H. & other authors. (2002).** Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15669–15674.
- Suárez, P. (2000).** Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus. *Vet Res* **31**, 47–55.
- Sugden, P. B., Cameron, B., Mina, M., Lloyd, A. R. & Lloyd, A. R. (2014).** Protection against hepatitis C infection via NK cells in highly-exposed uninfected injecting drug users. *Journal of Hepatology* **61**, 738–745.
- Sulkowski, M. S. & Thomas, D. L. (2003).** Hepatitis C in the HIV-Infected Person. *Ann Intern Med* **138**, 197–207.
- Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M. & Gale,**

- M. (2005).** Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *Journal of Virology* **79**, 2689–2699.
- Sun, H.-Y., Lin, C.-C., Lee, J.-C., Wang, S.-W., Cheng, P.-N., Wu, I.-C., Chang, T.-T., Lai, M.-D., Shieh, D.-B. & Young, K.-C. (2013).** Very low-density lipoprotein/lipo-viro particles reverse lipoprotein lipase-mediated inhibition of hepatitis C virus infection via apolipoprotein C-III. *Gut* **62**, 1193–1203.
- Sun, T. T., Zhao, H., Provet, J., Aebi, U. & Wu, X. R. (1996).** Formation of asymmetric unit membrane during urothelial differentiation. *Molecular biology reports* **23**(1), 3–11.
- Sung, P. S., Murayama, A., Kang, W., Kim, M.-S., Yoon, S. K., Fukasawa, M., Kondoh, M., Kim, J.-S., Kim, H. & other authors. (2014).** Hepatitis C virus entry is impaired by claudin-1 downregulation in diacylglycerol acyltransferase-1-deficient cells. *J Virol* **88**, 9233–9244.
- Suomalainen, M., Luisoni, S., Boucke, K., Bianchi, S., Engel, D. A. & Greber, U. F. (2013).** A direct and versatile assay measuring membrane penetration of adenovirus in single cells. *J Virol* **87**, 12367–12379.
- Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M. L., Bassendine, M., Spengler, U., Dore, G. J. & other authors. (2009).** IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat Genet* **41**, 1100–1104.
- Suroliya, R., Pachauri, M. & Ghosh, P. C. (2012).** Preparation and characterization of Monensin loaded PLGA nanoparticles: in vitro anti-malarial activity against *Plasmodium falciparum*. *J Biomed Nanotechnol* **8**, 172–181.
- Sutton, A. J., Gay, N. J., Edmunds, W. J., Hope, V. D., Gill, O. N. & Hickman, M. (2005).** Modelling the force of infection for hepatitis B and hepatitis C in injecting drug users in England and Wales. *BMC Infect Dis* **6**, 93–93.
- Svetlikova, D., Kabat, P., Ohradanova, A., Pastorek, J. & Betakova, T. (2010).** Influenza A virus replication is inhibited in IFN- λ 2 and IFN- λ 3 transfected or stimulated cells. *Antiviral Res* **88**, 329–333.
- Syder, A. J., Lee, H., Zeisel, M. B., Grove, J., Soulier, E., Macdonald, J., Chow, S., Chang, J., Baumert, T. F. & other authors. (2010).** Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *Journal of Hepatology* **54**, 48–55.
- Syed, G. H., Tang, H., Khan, M., Hassanein, T., Liu, J. & Siddiqui, A. (2014).** Hepatitis C virus stimulates low-density lipoprotein receptor expression to facilitate viral propagation. *J Virol* **88**, 2519–2529.

T

- Tabor, E., Gerety, R. J., Drucker, J. A., Seeff, L. B., Hoofnagle, J. H., Jackson, D. R., April, M., Barker, L. F. & Pineda-Tamondong, G. (1978).** Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet* **1**, 463–466.
- Tagawa, M., Kato, N., Yokosuka, O., Ishikawa, T., Ohto, M. & Omata, M. (1995).** Infection of human hepatocyte cell lines with hepatitis C virus in vitro. *J Gastroenterol Hepatol* **10**, 523–527.
- Takahashi, K., Asabe, S., Wieland, S., Garaigorta, U., Gastaminza, P., Isogawa, M. & Chisari, F. V. (2010).** Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 7431–7436.

- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., Miller, J. L., Manns, M. P. & Rehermann, B. (2000).** Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* **6**, 578–582.
- Tanabe, K. (1990).** Ion metabolism in malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells* **16**, 437–449.
- Tanabe, K. & Doi, S. (1989).** Rapid clearance of Plasmodium yoelii-infected erythrocytes after exposure to the ionophore A23187. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* **92**, 85–89.
- Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., Kurosaki, M., Matsuura, K., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Korenaga, M., Hino, K. & other authors. (2009).** Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* **41**, 1105–1109.
- Tartakoff, A. M. (1983).** Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore Monensin. *Cell* **32**, 1026–1028.
- Tartakoff, A. & Vassalli, P. (1979).** Plasma cell immunoglobulin M molecules. Their biosynthesis, assembly, and intracellular transport. *J Cell Biol* **83**, 284–299.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L. & Treadaway, J. (2008).** Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* **4**, e1000032–e1000032.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E. & Rice, C. M. (2004).** The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* **279**, 48576–48587.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2005).** Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* **435**, 374–379.
- Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E. & Shatsky, I. N. (2008).** Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 836–841.
- Terrault, N. A. (2002).** Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* **36**, S99–105.
- Terrault, N. A., Dodge, J. L., Murphy, E. L., Tavis, J. E., Kiss, A., Levin, T. R., Gish, R. G., Busch, M. P., Reingold, A. L. & Alter, M. J. (2013).** Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology* **57**, 881–889.
- Testoni, B., Durantel, D. & Levrero, M. (2013).** In vivo Ribavirin effects on interferon stimulated genes transcriptional regulation involves chromatin remodeling and histone methylation mediated by the G9a methyl-transferase. *Journal of Hepatology* **58**, S5.
- Thi, V. L. D., Granier, C., Zeisel, M. B., Guérin, M., Mancip, J., Granio, O., Penin, F., Lavillette, D., Bartenschlager, R. & other authors. (2012).** Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J Biol Chem* **287**, 31242–31257.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K. M., Steiger, C., Ray, S. C. & Chisari, F. V. (2001).** Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **194**, 1395–1406.
- Thimme, R., Binder, M. & Bartenschlager, R. (2012).** Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 663–683.

- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H. C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R. H. & Chisari, F. V. (2002).** Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15661–15668.
- Thio, C. L., Thomas, D. L., Goedert, J. J., Vlahov, D., Nelson, K. E., Hilgartner, M. W., O'Brien, S. J., Karacki, P., Marti, D. & other authors. (2001).** Racial differences in HLA class II associations with hepatitis C virus outcomes. *J Infect Dis* **184**, 16–21.
- Thomas, D. L., Vlahov, D., Solomon, L., Cohn, S., Taylor, E., Garfein, R. & Nelson, K. E. (1995).** Correlates of hepatitis C virus infections among injection drug users. *Medicine (Baltimore)* **74**, 212–220.
- Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S. I. & other authors. (2009).** Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* **461**, 798–801.
- Thomas, E., Gonzalez, V. D., Li, Q., Modi, A. A., Chen, W., Noureddin, M., Rotman, Y. & Liang, T. J. (2012).** HCV infection induces a unique hepatic innate immune response associated with robust production of type III interferons. *Gastroenterology* **142**, 978–988.
- Thompson, A. A., Zou, A., Yan, J., Duggal, R., Hao, W., Molina, D., Cronin, C. N. & Wells, P. A. (2009).** Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity. *Biochemistry* **48**, 906–916.
- Thompson, A. J., Muir, A. J., Sulkowski, M. S., Ge, D., Fellay, J., Shianna, K. V., Urban, T., Afdhal, N. H., Jacobson, I. M. & other authors. (2010).** Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* **139**, 120–e18.
- Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K. H., Köchel, H. G. & Uy, A. (1992).** Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* **181**, 293–300.
- Thurairajah, P. H., Hegazy, D., Chokshi, S., Shaw, S., Demaine, A., Kaminski, E. R., Naoumov, N. V. & Cramp, M. E. (2008).** Hepatitis C virus (HCV)--specific T cell responses in injection drug users with apparent resistance to HCV infection. *J Infect Dis* **198**, 1749–1755.
- Thursz, M., Yallop, R., Goldin, R., Trepo, C. & Thomas, H. C. (1999).** Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research. *Lancet* **354**, 2119–2124.
- Timpe, J. M., Stamataki, Z., Jennings, A., Hu, K., Farquhar, M. J., Harris, H. J., Schwarz, A., Desombere, I., Roels, G. L. & other authors. (2008).** Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* **47**, 17–24.
- Tomei, L., Vitale, R. L., Incitti, I., Serafini, S., Altamura, S., Vitelli, A. & De Francesco, R. (2000).** Biochemical characterization of a hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase mutant lacking the C-terminal hydrophobic sequence. *J Gen Virol* **81**(Pt 3), 759–767.
- Tsai, Y. C., Mendoza, A., Mariano, J. M., Zhou, M., Kostova, Z., Chen, B., Veenstra, T., Hewitt, S. M., Helman, L. J. & other authors. (2007).** The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis by targeting KAI1 for degradation. *Nat Med* **13**, 1504–1509.

- Tscherne, D. M., Evans, M. J., Hahn, von, T., Jones, C. T., Stamataki, Z., McKeating, J. A., Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2007).** Superinfection exclusion in cells infected with hepatitis C virus. *Journal of Virology* **81**, 3693–3703.
- Tseng, F.-C., O'Brien, T. R., Zhang, M., Kral, A. H., Ortiz-Conde, B. A., Lorvick, J., Busch, M. P. & Edlin, B. R. (2007).** Seroprevalence of hepatitis C virus and hepatitis B virus among San Francisco injection drug users, 1998 to 2000. *Hepatology* **46**, 666–671.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. & Nomoto, A. (1992).** Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology* **66**, 1476–1483.
- Tu, H., Gao, L., Shi, S. T., Taylor, D. R., Yang, T., Mircheff, A. K., Wen, Y., Gorbalenya, A. E., Hwang, S. B. & Lai, M. M. (1999).** Hepatitis C Virus RNA Polymerase and NS5A Complex with a SNARE-like Protein. *Virology* **263**, 30–41.
- Tu, Z., Pierce, R. H., Kurtis, J., Kuroki, Y., Crispe, I. N. & Orloff, M. S. (2010).** Hepatitis C Virus Core Protein Subverts the Antiviral Activities of Human Kupffer Cells. *Gastroenterology* **138**, 305–314.
- Tumova, L., Pombinho, A. R., Vojtechova, M., Stancikova, J., Gradl, D., Krausova, M., Sloncova, E., Horazna, M., Kriz, V. & other authors. (2014).** Monensin inhibits canonical Wnt signaling in human colorectal cancer cells and suppresses tumor growth in multiple intestinal neoplasia mice. *Mol Cancer Ther* **13**, 812–822.
- Turksen, K. & Troy, T. C. (2001).** Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev Dyn* **222**, 292–300.

U

- Urban, T. J., Thompson, A. J., Bradrick, S. S., Fellay, J., Schuppan, D., Cronin, K. D., Hong, L., McKenzie, A., Patel, K. & other authors. (2010).** IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **52**, 1888–1896.
- Urbina, J. A., Cohen, B. E., Perozo, E. & Cornivelli, L. (1987).** Spin-labeled amphotericin B: synthesis, characterization, biological and spectroscopic properties. *Biochim Biophys Acta* **897**, 467–473.
- Uribe, E. G. & Li, B. C. (1973).** Stimulation and inhibition of membrane-dependent ATP synthesis in chloroplasts by artificially induced K⁺ gradients. *J Bioenerg* **4**, 435–444.
- Utech, M., Mennigen, R. & Bruewer, M. (2010).** Endocytosis and recycling of tight junction proteins in inflammation. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 484987.
- Uzri, D. & Gehrke, L. (2009).** Nucleotide sequences and modifications that determine RIG-I/RNA binding and signaling activities. *Journal of Virology* **83**, 4174–4184.
- Uzzo, R. G. (2006).** Diverse effects of zinc on NF- κ B and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression. *Carcinogenesis* **27**, 1980–1990.

V

- Valli, M. B., Crema, A., Lanzilli, G., Serafino, A., Bertolini, L., Ravagnan, G., Ponzetto, A., Menzo, S., Clementi, M. & Carloni, G. (2007).** Molecular and cellular determinants of cell-to-cell transmission of HCV in vitro. *J Med Virol* **79**, 1491–1499.
- Van der Werf, J. H., Jonker, L. J. & Oldenbroek, J. K. (1998).** Effect of Monensin on milk production by Holstein and Jersey cows. *J Dairy Sci* **81**, 427–433.
- Van Soest, S., Westerveld, A., De Jong, P. T. V. M., Bleeker-Wagemakers, E. M. &**

- Bergen, A. A. B. (2015).** Retinitis Pigmentosa. *Survey of Ophthalmology* **43**, 321–334.
- van Spriel, A. B., Puls, K. L., Sofi, M., Pouniotis, D., Hochrein, H., Orinska, Z., Knobeloch, K. P., Plebanski, M. & Wright, M. D. (2004).** A Regulatory Role for CD37 in T Cell Proliferation. *The Journal of Immunology* **172**, 2953–2961.
- Vanderheijden, N., Delputte, P. L., Favoreel, H. W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P. A. & Nauwynck, H. J. (2003).** Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *Journal of Virology* **77**, 8207–8215.
- Vanni, E., Abate, M. L., Gentilcore, E., Hickman, I., Gambino, R., Cassader, M., Smedile, A., Ferrannini, E., Rizzetto, M. & other authors. (2009).** Sites and mechanisms of insulin resistance in nonobese, nondiabetic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **50**, 697–706.
- Vanwolleghem, T., Bukh, J., Meuleman, P., Desombere, I., Meunier, J.-C., Alter, H., Purcell, R. H. & Leroux-Roels, G. (2008).** Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver-chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain. *Hepatology* **47**, 1846–1855.
- Vassilaki, N., Boleti, H. & Mavromara, P. (2007).** Expression studies of the core+1 protein of the hepatitis C virus 1a in mammalian cells. The influence of the core protein and proteasomes on the intracellular levels of core+1. *FEBS J* **274**, 4057–4074.
- Vassilaki, N. & Mavromara, P. (2003).** Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem* **278**, 40503–40513.
- Vausselin, T., Calland, N., Belouzard, S., Descamps, V., Douam, F., Helle, F., François, C., Lavillette, D., Duverlie, G. & other authors. (2013).** The antimalarial ferroquine is an inhibitor of hepatitis C virus. *Hepatology* **58**, 86–97.
- Vercauteren, K., Mesalam, A. A., Leroux-Roels, G. & Meuleman, P. (2014).** Impact of lipids and lipoproteins on hepatitis C virus infection and virus neutralization. *World J Gastroenterol* **20**, 15975–15991.
- Verdegem, D., Badillo, A., Wieruszkeski, J.-M., Landrieu, I., Leroy, A., Bartenschlager, R., Penin, F., Lippens, G. & Hanouille, X. (2011).** Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 20441–20454.
- Vieyres, G., Brohm, C., Friesland, M., Gentzsch, J., Wölk, B., Roingeard, P., Steinmann, E. & Pietschmann, T. (2013a).** Subcellular localization and function of an epitope-tagged p7 viroporin in hepatitis C virus-producing cells. *J Virol* **87**, 1664–1678.
- Vieyres, G., Dubuisson, J. & Pietschmann, T. (2013b).** Incorporation of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion. *Viruses* **6**, 1149–1187.
- Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A. H. & Dubuisson, J. (2010).** Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol* **84**, 10159–10168.
- Vindrieux, D., Devailly, G., Augert, A., Le Calvé, B., Ferrand, M., Pigny, P., Payen, L., Lambeau, G., Perrais, M. & other authors. (2014).** Repression of PLA2R1 by c-MYC and HIF-2 α promotes cancer growth. *Oncotarget* **5**, 1004–1013.
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J. & Vu-Dac, N. (2005).** High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the

scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* **280**, 7793–7799.

W

- Wahid, A., Helle, F., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F. & Dubuisson, J. (2013).** Disulfide bonds in hepatitis C virus glycoprotein E1 control the assembly and entry functions of E2 glycoprotein. *J Virol* **87**, 1605–1617.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G. & other authors. (2005).** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**, 791–796.
- Walewski, J. L., Keller, T. R., Stump, D. D. & Branch, A. D. (2001).** Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* **7**, 710–721.
- Walker, G. M., Sullivan, P. A. & Shepherd, M. G. (1984).** Magnesium and the regulation of germ-tube formation in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **130**, 1941–1945.
- Wandeler, G., Gsponer, T., Bregenzler, A., Günthard, H. F., Clerc, O., Calmy, A., Stöckle, M., Bernasconi, E., Furrer, H. & other authors. (2012).** Hepatitis C virus infections in the Swiss HIV Cohort Study: a rapidly evolving epidemic. *Clin Infect Dis* **55**, 1408–1416.
- Wang, C., Sarnow, P. & Siddiqui, A. (1993).** Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of Virology* **67**(6), 3338–3344.
- Wang, J. H., Zheng, X., Ke, X., Dorak, M. T., Shen, J., Boodram, B., O’Gorman, M., Beaman, K., Cotler, S. J. & other authors. (2008).** Ethnic and geographical differences in HLA associations with the outcome of hepatitis C virus infection. *Virology* **6**, 46–46.
- Wang, N., Liang, Y., Devaraj, S., Wang, J., Lemon, S. M. & Li, K. (2009).** Toll-like receptor 3 mediates establishment of an antiviral state against hepatitis C virus in hepatoma cells. *Journal of Virology* **83**, 9824–9834.
- Wang, X. D., Kiang, J. G., Scheibel, L. W. & Smallridge, R. C. (1999).** Phospholipase C activation by Na⁺/Ca²⁺ exchange is essential for Monensin-induced Ca²⁺ influx and arachidonic acid release in FRTL-5 thyroid cells. *J Investig Med* **47**, 388–396.
- Washburn, M. L., Bility, M. T., Zhang, L., Kovalev, G. I., Buntzman, A., Frelinger, J. A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C. M. & Su, L. (2011).** A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* **140**, 1334–1344.
- Watanabe, H., Azuma, M., Igarashi, K. & Ooshima, H. (2005).** Valinomycin affects the morphology of *Candida albicans*. *J Antibiot* **58**, 753–758.
- Watanabe, K., Watanabe, J., Kuramitsu, S. & Maruyama, H. B. (1981).** Comparison of the activity of ionophores with other antibacterial agents against anaerobes. *Antimicrobial agents chemotherapy* **19**(4), 519–525.
- Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y. & Shimotohno, K. (2005).** Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* **19**, 111–122.
- Watkins, K. L., Bafundo, K. W. & Donovan, D. J. (1990).** Anticoccidial effect of Monensin against *Eimeria mitis* and *Eimeria dispersa*. *Poult Sci* **69**, 1009–1011.
- Watkins, K. L., Shryock, T. R., Dearth, R. N. & Saif, Y. M. (1997).** In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Vet Microbiol* **54**, 195–200.

- Wauquier, N., Padilla, C., Becquart, P., Leroy, E. & Vieillard, V. (2010).** Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection. *Immunogenetics*.
- Wedemeyer, H., Mizukoshi, E., Davis, A. R., Bennink, J. R. & Rehermann, B. (2001).** Cross-reactivity between hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. *Journal of Virology* **75**, 11392–11400.
- Weiner, A. J., Geysen, H. M., Christopherson, C., Hall, J. E., Mason, T. J., Saracco, G., Bonino, F., Crawford, K., Marion, C. D. & Crawford, K. A. (1992).** Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 3468–3472.
- Werner, J. M., Heller, T., Gordon, A. M., Sheets, A., Sherker, A. H., Kessler, E., Bean, K. S., Stevens, M., Schmitt, J. & Rehermann, B. (2013).** Innate immune responses in hepatitis C virus-exposed healthcare workers who do not develop acute infection. *Hepatology* **58**, 1621–1631.
- Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R. & Ahmed, R. (2003).** Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *Journal of Virology* **77**, 4911–4927.
- Wieland, S., Makowska, Z., Campana, B., Calabrese, D., Dill, M. T., Chung, J., Chisari, F. V. & Heim, M. H. (2014).** Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. *Hepatology* **59**, 2121–2130.
- Wietzke-Braun, P., Manhardt, L.-B., Rosenberger, A., Uy, A., Ramadori, G. & Mihm, S. (2007).** Spontaneous elimination of hepatitis C virus infection: a retrospective study on demographic, clinical, and serological correlates. *World J Gastroenterol* **13**, 4224–4229.
- Wietzke-Braun, P., Maouzi, A. B., Mänhardt, L. B., Bickeböller, H., Ramadori, G. & Mihm, S. (2006).** Interferon regulatory factor-1 promoter polymorphism and the outcome of hepatitis C virus infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **18**, 991–997.
- Wilkins, C., Woodward, J., Lau, D. T. Y., Barnes, A., Joyce, M., McFarlane, N., McKeating, J. A., Tyrrell, D. L. & Gale, M. (2013).** IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* **57**, 461–469.
- Wilkinson, J., Radkowski, M. & Laskus, T. (2009).** Hepatitis C virus neuroinvasion: identification of infected cells. *J Virol* **83**, 1312–1319.
- Willett, B. J., Hosie, M. J., Jarrett, O. & Neil, J. C. (1994).** Identification of a putative cellular receptor for feline immunodeficiency virus as the feline homologue of CD9. *Immunology* **81**, 228–233.
- Willett, B., Hosie, M., Shaw, A. & Neil, J. (1997).** Inhibition of feline immunodeficiency virus infection by CD9 antibody operates after virus entry and is independent of virus tropism. *J Gen Virol* **78 (Pt 3)**, 611–618.
- Windisch, M. P., Frese, M., Kaul, A., Trippler, M., Lohmann, V. & Bartenschlager, R. (2005).** Dissecting the interferon-induced inhibition of hepatitis C virus replication by using a novel host cell line. *Journal of Virology* **79**, 13778–13793.
- Witte, K., Gruetz, G., Volk, H.-D., Looman, A. C., Asadullah, K., Sterry, W., Sabat, R. & Wolk, K. (2009).** Despite IFN-lambda receptor expression, blood immune cells, but not keratinocytes or melanocytes, have an impaired response to type III interferons: implications for therapeutic applications of these cytokines. *Genes Immun* **10**, 702–714.
- Wittels, M. & Spear, P. G. (1991).** Penetration of cells by herpes simplex virus does not

require a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res* **18**, 271–290.

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. & other authors. (2008). CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol* **90**, 48–58.

Wong, M.-T. & Chen, S. S. L. (2014). Emerging roles of interferon-stimulated genes in the innate immune response to hepatitis C virus infection. *Cell Mol Immunol* doi: 10.1038/cmi.2014.127.

Wozniak, A. L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S. M. & Weinman, S. A. (2010). Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog* **6**, e1001087.

Wölk, B., Sansonno, D., Kräusslich, H. G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E. & Moradpour, D. (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of Virology* **74**, 2293–2304.

Wu, C.-Y., Jan, J.-T., Ma, S.-H., Kuo, C.-J., Juan, H.-F., Cheng, Y.-S. E., Hsu, H.-H., Huang, H.-C., Wu, D. & other authors. (2004). Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 10012–10017.

Wu, J., Peng, X., Zhou, A., Qiao, M., Wu, H., Xiao, H., Liu, G., Zheng, X., Zhang, S. & Mei, S. (2014a). MiR-506 inhibits PRRSV replication in MARC-145 cells via CD151. *Mol Cell Biochem* **394**, 275–281.

Wu, X., Lee, E. M., Hammack, C., Robotham, J. M., Basu, M., Lang, J., Brinton, M. A. & Tang, H. (2014b). Cell death-inducing DFFA-like effector b is required for hepatitis C virus entry into hepatocytes. *J Virol* **88**, 8433–8444.

Wünschmann, S., Medh, J. D., Klinzmann, D., Schmidt, W. N. & Stapleton, J. T. (2000). Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *Journal of Virology* **74**, 10055–10062.

X

Xie, M. H., Aggarwal, S., Ho, W. H., Foster, J., Zhang, Z., Stinson, J., Wood, W. I., Goddard, A. D. & Gurney, A. L. (2000). Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* **275**, 31335–31339.

Xie, Z. C., Riezu-Boj, J. I., Lasarte, J. J., Guillen, J., Su, J. H., Civeira, M. P. & Prieto, J. (1998). Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* **244**, 513–520.

Xu, C., Zhang, Y. H., Thangavel, M., Richardson, M. M., Liu, L., Zhou, B., Ostrom, R. S. & Zhang, X. A. (2009). CD82 endocytosis and cholesterol-dependent reorganization of tetraspanin webs and lipid rafts. *The FASEB Journal* **23**(10), 3273–3288.

Xu, X., Chen, H., Cao, X. & Ben, K. (2007). Efficient infection of tree shrew (*Tupaia belangeri*) with hepatitis C virus grown in cell culture or from patient plasma. *J Gen Virol* **88**, 2504–2512.

Xu, Y., Martinez, P., Séron, K., Luo, G., Allain, F., Dubuisson, J. & Belouzard, S. (2015). Characterization of hepatitis C virus interaction with heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Virology* **89**(7), 3846–3858.

Xu, Z., Choi, J., Yen, T. S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M.

J. & Ou, J. (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* **20**, 3840–3848.

Xu, Z., Choi, J., Lu, W. & Ou, J.-H. (2003). Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* **77**, 1578–1583.

Y

Yagnik, A. T., Lahm, A., Meola, A., Roccasecca, R. M., Ercole, B. B., Nicosia, A. & Tramontano, A. (2000). A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins* **40**, 355–366.

Yamane, D., McGivern, D. R., Masaki, T. & Lemon, S. M. (2013). Liver injury and disease pathogenesis in chronic hepatitis C. *Curr Top Microbiol Immunol* **369**, 263–288.

Yamasaki, M., Nakamura, K., Tamura, N., Hwang, S.-J., Yoshikawa, M., Sasaki, N., Ohta, H., Yamato, O., Maede, Y. & Takiguchi, M. (2009). Effects and mechanisms of action of ionophorous antibiotics valinomycin and salinomycin-Na on *Babesia gibsoni* in vitro. *J Parasitol* **95**, 1532–1538.

Yanagi, M., St Claire, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J. (1999). In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2291–2295.

Yang, W., Qiu, C., Biswas, N., Jin, J., Watkins, S. C., Montelaro, R. C., Coyne, C. B. & Wang, T. (2008a). Correlation of the Tight Junction-like Distribution of Claudin-1 to the Cellular Tropism of Hepatitis C Virus. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 8643–8653.

Yang, X. (2004). Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes. *The Journal of Cell Biology* **167**, 1231–1240.

Yang, X. H., Richardson, A. L., Torres-Arzayus, M. I., Zhou, P., Sharma, C., Kazarov, A. R., Andzelm, M. M., Strominger, J. L., Brown, M. & Hemler, M. E. (2008b). CD151 Accelerates Breast Cancer by Regulating $\alpha 6$ Integrin Function, Signaling, and Molecular Organization. *Cancer Research* **68**, 3204–3213.

Yang, X., Claas, C., Kraeft, S.-K., Chen, L. B., Wang, Z., Kreidberg, J. A., & Hemler, M. E. (2002). Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Molecular Biology of the Cell* **13**(3), 767–781.

Yao, N., Reichert, P., Taremi, S. S., Prosise, W. W. & Weber, P. C. (1999). Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure* **7**, 1353–1363.

Yao, Z. Q., Eisen-Vandervelde, A., Waggoner, S. N., Cale, E. M. & Hahn, Y. S. (2004). Direct binding of hepatitis C virus core to gC1qR on CD4⁺ and CD8⁺ T cells leads to impaired activation of Lck and Akt. *Journal of Virology* **78**, 6409–6419.

Yauch, R. L. (2000). Direct Extracellular Contact between Integrin $\alpha 3\beta 1$ and TM4SF Protein CD151. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 9230–9238.

Yauch, R. L., Berditchevski, F., Harler, M. B., Reichner, J. & Hemler, M. E. (1998a). Highly stoichiometric, stable and specific association of integrin $[\alpha]3[\beta]1$ with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase and may regulate cell migration. *Mol Biol Cell* **9**, 2751–2765.

Yauch, R. L., Berditchevski, F., Harler, M. B., Reichner, J. & Hemler, M. E. (1998b). Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin $\alpha 3\beta 1$ with

- CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. *Mol Biol Cell* **9**, 2751–2765.
- Yáñez-Mó, M., Barreiro, O., Gonzalo, P., Batista, A., Megías, D., Genís, L., Sachs, N., Sala-Valdés, M., Alonso, M. A. & other authors. (2008).** MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells. *Blood* **112**, 3217–3226.
- Yeh, C. T., Lo, S. Y., Dai, D. I., Tang, J. H., Chu, C. M. & Liaw, Y. F. (2000).** Amino acid substitutions in codons 9-11 of hepatitis C virus core protein lead to the synthesis of a short core protein product. *J Gastroenterol Hepatol* **15**, 182–191.
- Yi, M. & Lemon, S. M. (2003).** 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology* **77**, 3557–3568.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J. & Lemon, S. M. (2006).** Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *Journal of Virology* **81**, 629–638.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J. & Lemon, S. M. (2009).** Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. *PLoS Pathog* **5**, e1000403.
- Yokoyama, K., Takahashi, M., Nishizawa, T., Nagashima, S., Jirintai, S., Yotsumoto, S., Okamoto, H. & Momoi, M. Y. (2011).** Identification and characterization of a natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant hepatitis C virus in Japan. *Arch Virol* **156**, 1591–1601.
- Yoo, J. C., Kim, J. H., Ha, J. W., Park, N. S., Sohng, J. K., Lee, J. W., Park, S. C., Kim, M. S. & Seong, C. N. (2007).** Production and biological activity of Laidlomycin, anti-MRSA/VRE antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684. *J Microbiol* **45**(1), 6-10.
- Yoon, J. C., Lim, J.-B., Park, J. H. & Lee, J. M. (2011).** Cell-to-cell contact with hepatitis C virus-infected cells reduces functional capacity of natural killer cells. *Journal of Virology* **85**, 12557–12569.
- Yoon, M. J., Kang, Y. J., Kim, I. Y., Kim, E. H., Lee, J. A., Lim, J. H., Kwon, T. K. & Choi, K. S. (2013).** Monensin, a polyether ionophore antibiotic, overcomes TRAIL resistance in glioma cells via endoplasmic reticulum stress, DR5 upregulation and c-FLIP downregulation. *Carcinogenesis* **34**, 1918–1928.
- Yoshida, T., Kawano, Y., Sato, K., Ando, Y., Aoki, J., Miura, Y., Komano, J., Tanaka, Y. & Koyanagi, Y. (2008).** A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic* **9**, 540–558.
- Yu, D. & Turner, J. R. (2008).** Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: The role of membrane traffic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**, 709–716.
- Yu, G.-Y., Lee, K.-J., Gao, L. & Lai, M. M. C. (2006).** Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *Journal of Virology* **80**, 6013–6023.
- Yue, S., Mu, W., Erb, U. & Zoller, M. (2014).** The tetraspanins CD151 and Tspan8 are essential exosome components for the crosstalk between cancer initiating cells and their surrounding. *Oncotarget* **6**(4), 2366-2384.
- Yutani, S., Yamada, A., Yoshida, K., Takao, Y., Tamura, M., Komatsu, N., Ide, T., Tanaka, M., Sata, M. & Itoh, K. (2007).** Phase I clinical study of a personalized peptide vaccination for patients infected with hepatitis C virus (HCV) 1b who failed to respond to interferon-based therapy. *Vaccine* **25**, 7429–7435.

Z

- Zahid, M. N., Turek, M., Xiao, F., Thi, V. L. D., Guérin, M., Fofana, I., Bachellier, P., Thompson, J., Delang, L. & other authors. (2013).** The postbinding activity of scavenger receptor class B type I mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination. *Hepatology* **57**, 492–504.
- Zavaglia, C., Martinetti, M., Silini, E., Bottelli, R., Daielli, C., Asti, M., Airoidi, A., Salvaneschi, L., Mondelli, M. U. & Ideo, G. (1998).** Association between HLA class II alleles and protection from or susceptibility to chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* **28**, 1–7.
- Zeisel, M. B., Fofana, I., Fafi-Kremer, S. & Baumert, T. F. (2011).** Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *Journal of Hepatology* **54**, 566–576.
- Zeisel, M. B., Koutsoudakis, G., Schnober, E. K., Haberstroh, A., Blum, H. E., Cosset, F.-L., Wakita, T., Jaeck, D., Doffoël, M. & other authors. (2007).** Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* **46**, 1722–1731.
- Zeremski, M., Shu, M. A., Brown, Q., Wu, Y., Jarlais, Des, D. C., Busch, M. P., Talal, A. H. & Edlin, B. R. (2009).** Hepatitis C virus-specific T-cell immune responses in seronegative injection drug users. *J Viral Hepat* **16**, 10–20.
- Zhang, B., Wang, X., Cai, F., Chen, W., Loesch, U., Bitzer, J. & Zhong, X. Y. (2012).** Effects of salinomycin on human ovarian cancer cell line OV2008 are associated with modulating p38 MAPK. *Tumour Biol* **33**, 1855–1862.
- Zhang, S., Kodys, K., Babcock, G. J. & Szabo, G. (2013).** CD81/CD9 tetraspanins aid plasmacytoid dendritic cells in recognition of hepatitis C virus-infected cells and induction of interferon-alpha. *Hepatology* **58**, 940–949.
- Zhao, X., Tang, Z.-Y., Klumpp, B., Wolff-Vorbeck, G., Barth, H., Levy, S., Weizsäcker, von, F., Blum, H. E. & Baumert, T. F. (2001).** Primary hepatocytes of Tupaia belangeri as a potential model for hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* **109**, 221–232.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M. & Deng, H. (2007).** Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *Journal of Virology* **81**, 12465–12471.
- Zhi-ming, L., Yu-lian, J., Zhao-lei, F., Chun-xiao, W., Zhen-fang, D., Bing-chang, Z. & Yue-ran, Z. (2007).** Polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptor gene: possible association with susceptibility to or clearance of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *Croat Med J* **48**, 800–806.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T. & Chisari, F. V. (2005).** Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9294–9299.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Chung, J., Stamataki, Z., Isogawa, M., Cheng, G., McKeating, J. A. & Chisari, F. V. (2006).** Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host. *Journal of Virology* **80**, 11082–11093.
- Zhou, B., Liu, L., Reddivari, M. & Zhang, X. A. (2004).** The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity. *Cancer Res* **64**, 7455–7463.
- Zhou, S., Wang, F., Wong, E. T., Fonkem, E., Hsieh, T.-C., Wu, J. M. & Wu, E. (2012).** Salinomycin: a novel anti-cancer agent with known anti-coccidial activities. *Curr Med Chem* **20**, 4095–4101.

- Zhu, Q., Guo, J.-T. & Seeger, C. (2003).** Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *Journal of Virology* **77**, 9204–9210.
- Zhu, Y.-Z., Luo, Y., Cao, M.-M., Liu, Y., Liu, X.-Q., Wang, W., Wu, D.-G., Guan, M., Xu, Q.-Q. & other authors. (2012).** Significance of palmitoylation of CD81 on its association with tetraspanin-enriched microdomains and mediating hepatitis C virus cell entry. *Virology* **429**, 112–123.
- Zoller, M. (2009).** Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer* **9**, 40–55.
- Zona, L., Lupberger, J., Sidahmed-Adrar, N., Thumann, C., Harris, H. J., Barnes, A., Florentin, J., Tawar, R. G., Xiao, F. & other authors. (2013).** HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* **13**, 302–313.

Annexe