



HAL
open science

Nouveaux rôles de l'apolipoprotéine E dans le cycle du virus de l'hépatite C : Docteur Jekyll ou Mister Hyde ?

Émilie Crouchet

► **To cite this version:**

Émilie Crouchet. Nouveaux rôles de l'apolipoprotéine E dans le cycle du virus de l'hépatite C : Docteur Jekyll ou Mister Hyde ?. Virologie. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ036 . tel-01494114

HAL Id: tel-01494114

<https://theses.hal.science/tel-01494114>

Submitted on 22 Mar 2017

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.

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé ED_414
UMR1110 Interactions virus-hôte et maladies hépatiques

THÈSE présentée par :
Emilie CROUCHET

Soutenue le : **9 Septembre 2016**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline: Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité: Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Option: Virologie

**NOUVEAUX ROLES DE L'APOLIPOPROTEINE E
DANS LE CYCLE DU VIRUS DE L'HEPATITE C :
DOCTEUR JEKYLL OU MISTER HYDE ?**

THÈSE dirigée par :

Directeur de thèse : Dr Catherine SCHUSTER, HDR, DR Inserm,
Université de Strasbourg, France

RAPPORTEURS :

Rapporteur externe : Dr Sophie CLEMENT-LEBOUBE, Université de
Genève, Suisse

Rapporteur externe : Prof. Philippe ROINGEARD, HDR, PU-PH, Université
de Tours, France

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Examineur Prof. Philippe GEORGEL, HDR, PU, Université de
Strasbourg, France

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail. Merci au Docteur Sophie Clément-Leboube et au Professeur Philippe Roingeard, mes rapporteurs externes, ainsi qu'au Professeur Philippe Georgel pour avoir accepté d'être mon examinateur. Je tiens également à remercier le Professeur Thomas Baumert de m'avoir permis d'intégrer l'unité INSERM U1110 où j'ai acquis rigueur et connaissances scientifiques.

Cette thèse est pour moi l'aboutissement d'une grande aventure humaine et scientifique, qui m'a permis de grandir et de devenir la personne que je suis aujourd'hui. Je tiens beaucoup à remercier Catherine Schuster, ma directrice de thèse, sans qui je ne serais jamais arrivée jusqu'ici. Tu m'as beaucoup appris et soutenue tout au long de cette thèse. J'ai également beaucoup apprécié tes qualités humaines et tes précieux conseils pour avancer scientifiquement, mais aussi dans la vie (les petites phrases du jour...). Je tiens également à remercier Anne Zeter, ton binôme de choc et de méditation, pour nos nombreuses discussions philosophiques et ses nombreux « dépatouillages » administratifs. Et oui Anne, tu as toujours raison !

J'aimerais remercier tout particulièrement deux personnes qui m'ont beaucoup soutenues durant les périodes les plus difficiles de cette thèse et avec qui j'ai également passé de très bons moments de complicité. Merci beaucoup Catherine et Sarah, je vous dois beaucoup les filles !

Un grand merci à Marie et Marine (Marinouuuuuuu), deux techniciennes de choc qui m'ont beaucoup aidé durant les terribles mois de révision de papier. Sans vous, je pense que je serais encore en train de faire des western-blots à l'heure actuelle...

Merci aux membres de la « team Schuster », SeungAe, Marie, Tonia, Vincent (un nouveau poussin !), mes voisins de paillasse, pour nos moments de papotages et de complicité lors de nos déboires de manip. Je remercie également Mathieu et Lamine, les anciens de la « team Schuster ». Vous m'avez formé et beaucoup appris lorsque je n'étais encore qu'un poussin dans l'unité. Vous êtes deux personnes formidables.

Merci à la « badminton team », Thomas D, Jérémy, Eloi et JB. Merci pour tous ces moments de rigolade sportive ! J'espère continuer à échanger des volants avec vous.

Je voudrais remercier Emilie, toujours optimiste, toujours à 100%. Merci de m'avoir fait découvrir ce sport génial qu'est le taekwondo ! Merci aussi pour ton grand soutien. Petit clin d'œil spécial à Mathieu G, ton stagiaire : merci pour cette main rassurante ! Merci également au reste de la bande, Eric D, Sophie, Lucas, Aram, JB!

Je voudrais également remercier tous les membres de l'U1110 avec qui j'ai pu travailler tout au long de ma thèse. Merci Christine, tu as été une vraie maman de substitution pour moi. Merci Mirjam pour tes conseils et ton aide dans la recherche d'un post-doc. Merci également à Laura, Charlotte, Nelly, Eloi, Che, Nourdine, Hussein (ah bah oui, c'est pas facile hein), Eric R, Olga, Franck, Simonetta, Nicolaas, Nicolas et Richard (les « grotteux »), Joachim et Andres (vive le Jäger !!). Sans oublier les anciens : Dan, Daniel, Laetitia, Marine T, Fei, Nauman, Rajeev et Tao... Et la team HIV : Sylvie, Gégé, Bin, Christiane, Lutzia, Camille, Jérôme et Thomas D.

Merci à Catherine C, Sigis, Dominique (Dom), Jérémy et Patricia (Pat) pour votre disponibilité et votre grande gentillesse. L'unité ne pourrait pas aussi bien fonctionner au quotidien sans vous !

Merci également à Eric S, pour nos nombreux moments de commérages et de rigolades. Tu es le champion de l'extraction et de la qRT-PCR. Merci de m'avoir décerné en retour le titre de Westernblotteuse !

Je tiens également à remercier Florent, Christine A, Roxanne et Joëlle pour notre collaboration qui s'est déroulée dans une très bonne ambiance.

Un grand merci à mes amies Juline et Delphine (ma phiphine en carton), qui sont bientôt Docteur également et avec qui nous avons partagé tellement de déboire et d'anecdotes tout au long de notre thèse... Notre soutien mutuel a été d'une grande importance pour moi. Vous êtes deux personnes fantastiques et deux scientifiques hors-pairs. Je suis tellement fière de vous et de votre réussite. Je pense que nous allons bientôt pouvoir entamer un CAP coiffure ou aller vendre des tartes... Un grand merci également à Maxime, Fanny, Clémentine et Jo.

Un merci spécial à l'équipe du Chaudron, Laeti, Séba, Juju, Fabienne, Ana, Momo et Manu. Merci à mes belges préférés. Je suis arrivée chez vous à 16 ans, alors que je n'étais qu'une grande enfant. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler et de m'ouvrir au monde à vos côtés.

Un énorme merci à mes parents, mon papou et ma maman, ainsi qu'à ma sœur Sophie (Burger), pour m'avoir tant soutenue et surtout supportée durant ces quatre années. Merci beaucoup d'avoir cru en moi et d'avoir toujours été fiers de moi. Merci aussi à toute ma très grande famille ! Une page entière ne suffirait pas à citer leur nom mais ils sont tous dans mon cœur. Vive les Ardennes !

Enfin, un dernier merci à Laurent, mon amour, pour t'être si bien occupé de moi durant ces derniers mois très intenses, et pour avoir cru en moi. Je n'y serais jamais arrivée sans toi...

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	3
ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION.....	7
I. Généralités	7
1. Découverte du virus de l'hépatite C : la traque d'une décennie	7
2. Epidémiologie	7
3. Transmission du virus	10
II. Histoire naturelle de l'infection par le HCV.....	11
1. Physiopathologie du foie	11
2. Evolution de l'infection par HCV	13
3. Hépatite aiguë	14
4. Hépatite chronique : de la fibrose à la cirrhose hépatique.....	14
5. Hépatite chronique : troubles métaboliques associés.....	16
6. Cancers du foie HCV-induits.....	17
7. Manifestations extra-hépatiques.....	18
III. Réponse immunitaire de l'hôte	20
1. Réponse immunitaire innée anti-HCV.....	20
a) Mécanisme de défense anti-HCV	20
b) Contre attaque virale : voler sous le radar	23
2. Réponse immunitaire adaptative anti-HCV	25
a) Réponse humorale : rôle des anticorps neutralisants.....	25
b) Evasion virale aux nAbs.....	26
c) Les cellules dendritiques: lien entre les réponses innée et adaptative.....	27
d) Réponse cellulaire : rôle des LT	28
e) Echappement du HCV à la réponse des LT	29
f) Implications pour la recherche vaccinale	30
IV. Diagnostic et traitements	30
1. Marqueurs de l'infection virale et méthodes de diagnostic	30
2. Les traitements anti-HCV : aux armes <i>etc</i>	32
a) Les DAA	33
b) Les HTA.....	35
c) Thérapies anti-HCV : le début de la fin ?.....	36
3. La transplantation hépatique	37
V. Le métabolisme des lipoprotéines	39
1. Classification et structure des lipoprotéines.....	39
2. Les différentes voies de transport des lipides	42
a) La voie exogène ou voie entéro-hépatique.....	42
b) La voie endogène de transport des lipides : rôle des VLDL, IDL, LDL.....	45
c) La voie de transport inverse du cholestérol	46
3. ApoE : au delà du transport des lipides.....	49
a) Relations structure-fonction.....	49
b) Rôle d'apoE dans le métabolisme des lipoprotéines	51
c) Quand apoE devient l'ennemie : développement des maladies métaboliques.....	53
VI. Le virus de l'hépatite C.....	55
1. Classification.....	55
2. La curieuse nature de la particule virale du HCV	55
3. Organisation génomique.....	58
4. Les protéines virales	59
a) Core.....	59
b) Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2	61
c) La viroporine p7	63

d) La protéine non structurale NS2.....	64
e) Le complexe NS3/NS4A.....	65
f) NS4B : rendez-vous en terre inconnue	67
g) NS5A : une protéine « couteau-suisse ».....	68
h) La polymérase virale NS5B.....	70
VII. Les modèles d'étude du virus : du chimpanzé aux HCVcc	71
1. Modèles animaux.....	71
a) Le chimpanzé : modèle historique	71
b) Les modèles murins.....	72
2. Modèles cellulaires.....	77
a) Le modèle réplicon.....	77
b) Les pseudo-particules rétrovirales ou HCVpp.....	78
c) Le modèle HCV en culture cellulaire ou HCVcc.....	78
d) Un modèle alternatif : les HCV _{TCP}	79
e) Vers un modèle plus proche de la physiologie	80
VIII. Le cycle viral du HCV : connexion intime avec le métabolisme lipidique	81
1. L'entrée virale : de l'attachement du virus à la fusion membranaire	82
2. Traduction de la polyprotéine virale.....	85
a) Rappel sur l'initiation de la traduction cap-dépendante.....	86
b) Traduction IRES-dépendante du HCV	86
c) Facteurs influençant la traduction IRES-dépendante du HCV	88
3. Réplication du génome viral	90
a) Mécanisme de réplication.....	90
b) Formation du <i>membranous web</i>	91
c) Importance des facteurs de l'hôte et du métabolisme des lipides	92
4. Assemblage et export des particules virales	94
a) Le trafic intracellulaire de core : déterminant de l'assemblage viral	94
b) Assemblage et maturation des particules virales	95
OBJECTIFS DE LA THESE.....	99
RESULTATS PREMIERE PARTIE.....	101
I. Contexte de l'étude	101
II. Résultats	102
III. Discussion et perspectives	133
RESULTATS DEUXIEME PARTIE.....	143
I. Contexte de l'étude	143
II. Résultats	144
III. Discussion et perspectives	161
CONCLUSION GENERALE	165
BIBLIOGRAPHIE	166
ANNEXES	201

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Prévalence mondiale de l'hépatite C en 2010 (%).....	8
Figure 2. Prévalence relative de chaque génotype du HCV dans le monde.....	9
Figure 3. Architecture du foie humain.....	12
Figure 4. Histoire naturelle de l'infection par HCV.....	13
Figure 5. Développement de la fibrose hépatique.....	15
Figure 6. Développement du CHC lors de l'infection par HCV.....	19
Figure 7. Réponse immunitaire innée anti-HCV.....	22
Figure 8. Mécanisme de contre-attaque virale.....	24
Figure 9. Evolution des marqueurs virologiques durant une infection HCV aiguë résolutive (A) et une infection HCV chronique (B).....	31
Figure 10. Propriétés physicochimiques des lipoprotéines sanguines.....	40
Figure 11. Structure des lipoprotéines, exemple des VLDL.....	41
Figure 12. Métabolisme des TRL : voie exogène et endogène de transport des lipides.....	44
Figure 13. Métabolisme des HDL: voie de transport inverse du cholestérol.....	48
Figure 14. Structure de l'apoE libre humaine.....	50
Figure 15. Le recyclage d'apoE induit la formation d'HDL.....	52
Figure 16. Arbre phylogénétique de la famille des <i>Flaviviridae</i>	56
Figure 17. Structure schématique de la LVP.....	57
Figure 18. Organisation génétique du HCV et maturation de la polyprotéine virale.....	58
Figure 19. Représentation schématique de la protéine de capsid Core.....	60
Figure 20. Structure 3D de l'ectodomaine d'E2 et comparaison avec une protéine de fusion de classe II.....	62
Figure 21. Structure 3D du domaine Nter d'E1 (nE1).....	63
Figure 22. Structure 3D de p7 et du canal ionique hexamérique.....	64
Figure 24. Structure 3D du complexe NS3-NS4A.....	66
Figure 25. Structure schématique de la protéine NS4B.....	67
Figure 26. Structure de la protéine NS5A.....	69
Figure 27. Structure de la polymérase virale NS5B.....	71
Figure 28. Trois grandes stratégies pour obtenir des souris susceptibles au HCV.....	76
Figure 29. Trois modèles principaux pour l'étude du cycle viral du HCV en culture cellulaire.....	80
Figure 30. Cycle viral du HCV.....	82
Figure 31. Entrée virale du HCV dans les hépatocytes.....	84
Figure 32. Structure de l'IRES du HCV et initiation de la traduction IRES-dépendante.....	88
Figure 33. DMV et complexe de réplication virale.....	92
Figure 34. Assemblage et export des particules virales du HCV dans les hépatocytes.....	97
Figure 35. Différence conformationnelle entre les deux formes libre et liée d'apoE.....	97
Figure 36. Différences structurales entre les 3 principales isoformes d'apoE.....	97
Figure 37. Les voies de signalisation de l'AMPK dans les hépatocytes.....	97

ABBREVIATIONS

aa : acide aminé	cPLA2G4A : cytosolic phospholipase A2 group IVA
ABCA1 : ATP binding cassette subfamily A member 1 human	CSH : cellule stellaire hépatique
ABCG1 : ATP binding cassette subfamily G member 1 human	Cter : C terminal
ACAT : acyl-CoA cholesterol acyltransferase	CypA : cyclophiline A
AG : acide gras	DAA : direct-acting antiviral agent
Ago : argonaute	DC : dendritic cell
ALAT : alanine aminotransférase	DGAT : diacylglycérol acyltransférase
AMPK : adenosine 5' monophosphate activated protein kinase	DMSO : dimethyl sulfoxide
AP2M1 : clathrin assembly protein complex 2 medium chain μ 1	DMV : double-membrane vesicle
apo : apolipoprotéine	DTM : domaine transmembranaire
apoE : apolipoprotéine E	EGFR : epidermal growth factor receptor
ARNdb : ARN double brin	eIF : eucaryotic initiation factor
ARNsb : ARN simple brin	EMCV : Encephalomyocarditis Virus
CARD : caspase recrutement domain	ESCRT : endosomal sorting complex required for transport
CD81 : cluster de différenciation 81	FABP : fatty acid binding protein
CE : cholestérol estérifié	FAH : fumaryle acetoacetate hydrolase
CETP : cholesteryl ester transfer protein	GAG : glycosaminoglycane
cGL : gouttelette lipidique cytosolique	GBV-B : GB virus B
CHC : carcinome hépatocellulaire	GL : gouttelettes lipidiques
CKII: caséine kinase II	HAV: virus de l'hépatite A
CL : cholestérol libre	HBV : virus de l'hépatite B
CLDN1 : claudine 1	HCV : virus de l'hépatite C
CM : chylomicron	HCVcc : HCV produit en culture cellulaire
CPA : cellule présentatrice d'antigène	HCVpp : HCV pseudoparticule
	HDL : high density lipoprotein
	HIV: virus de l'immunodéficience humaine

HLA : human leukocyte antigen	LVP : lipo-viro-particule
HLP III : hyperlipoprotéinémie de type III	LXR : liver X receptor
HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme-A réductase	MAPK : mitogen-activated protein kinases
HSPG : heparan sulfate proteoglycan	MAVS : mitochondrial antiviral signaling protein
HTA : host-targeting agent	MDA5 : melanoma differentiation-associated protein 5
Huh : human hepatoma cells	MEC : matrice extracellulaire
HVR : hypervariable region	MEH : manifestation extrahépatique
IDL : intermediate density lipoprotein	miR : microRNA
IFN : interféron	miRISC : miRNA-induced silencing complex
IFNAR : IFN- α/β receptor	MLV : murine leukemia virus
IFNLR : IFN- λ receptor	MMV : multi-membrane vesicle
IKK ϵ : I κ B kinase- ϵ	MTP : microsomal triglyceride transfer protein
IL : interleukine	MW : membranous web
IRES : internal ribosome entry site	nAbs : neutralizing antibodies
IRF : interféron regulatory factor	NANB : non-A, non-B
IRF9 : IFN regulatory factor 9	Neo : gène de résistance à la néomycine
ISG : interféron stimulated gene	NPC1L1 : Niemann-Pick C1 like 1
ISGF3 : IFN-stimulated gene factor 3.	NPHV : non-primate hepacivirus
ITAF : IRES trans-acting factors	NS : non structurale
JAK : Janus kinase	Nter : N terminal
LCS : low complexity sequence	OCLN : occludine
LDL : low density lipoprotein	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
LDLR : low density lipoprotein receptor	ORF : open reading frame
LKB1 : liver kinase B1	OSBP : oxysterol-binding protein
LPL : lipoprotéine lipase	PAM : pathogen-associated molecular patterns
LRP1 : LDLR related protein 1	PCSK9 : proprotéine convertase subtilisin-kexin type 9
LT : lymphocyte T	
luGL : gouttelette lipidique luminale	

PD-1 : receptor programmed cell death 1	SR-BI : scavenger receptor class B type I
PHH : primary human hepatocyte	SREPB : sterol regularoty element-binding protein
PI4KIII α : phosphatidylinosytol 4-kinase III α	STAT : signal transducers and activators of transcription
PKR : protéine kinase R	SVR : sustained virological response
PL : phospholipide	TBK1 : TANK-binding kinase 1
PLTP : phospholipid transfer protein	TCR : T cell receptor
PPI : prolyl-peptidyl isomérase	TG : triglycérides
PRR : pattern recognition receptors	TH : transplantation hépatique
PSTPIP2 : proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	TLR : toll-like receptor
RACK1 : Receptor for activated C kinase 1	TRAF3 : tumor necrosis factor receptor-associated factor 3
Rb : retinoblastoma protein	Tregs : cellules T régulatrices
RdRp : RNA dependent RNA polymerase	TRIF : TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β
RE : reticulum endoplasmique	TRL : triglyceride rich lipoproteins
RIG-I : retinoic acid-inducible gene I	TYK : tyrosine kinase
RLR : RIG-I-like receptor	UDI : utilisateurs de drogues par voie intraveineuse
RT-qPCR : real time quantitative polymerisation chain reaction	uPA : urokinase-type plasminogen activator transgene
RTH : re-transplantation hépatique	UTR : untranslated region
SCID : severe combined immunodeficiency	VLDL : very low density lipoprotein
SNP : single nucleotide polymorphism	
SOCS3 : suppressor of cytokine signaling 3	

INTRODUCTION

I. Généralités

1. Découverte du virus de l'hépatite C : la traque d'une décennie

Au début des années 1970, le virus de l'hépatite A (HAV) et le virus de l'hépatite B (HBV) étaient les seuls agents étiologiques connus pour être responsables d'hépatites virales. C'est en 1975 que Stephen Feinstone et son équipe proposèrent le concept nouveau d'hépatite non-A, non-B (NANB). En effet, le développement de tests sérologiques visant à discriminer les infections par ces deux virus a permis de découvrir qu'un grand nombre d'hépatites virales transmises après transfusion sanguine n'était dû ni au HAV ni au HBV, mais à un troisième agent infectieux encore inconnu (Feinstone *et al.*, 1975). Trois ans plus tard, le développement du modèle chimpanzé a permis une réelle avancée dans l'étude des hépatites NANB. En effet, les formes aiguës et chroniques de la maladie ont pu être reproduites chez l'animal par injection de sérums de patients infectés (Alter *et al.*, 1978). Cependant, malgré de nombreuses études, l'agent responsable de cette infection n'a pu être identifié que 10 ans plus tard. A partir de 1983, l'équipe du professeur Michael Houghton et ses collaborateurs ont établi plusieurs banques d'ADNc à partir de foie et de plasma de chimpanzés infectés. Ces banques ont ensuite été immunocriblées par des sérums de patients présentant une hépatite NANB (pour revue, voir Houghton, 2009). Après 6 années de recherches infructueuses et le screening d'une centaine de millions de clones bactériens, Qui-Lim Choo obtint un seul clone positif, exprimant un épitope viral de ce nouvel agent étiologique nommé virus de l'hépatite C (HCV) (Choo *et al.*, 1989). Cette découverte historique a permis d'identifier et de séquencer le génome du HCV, mais a également permis, dès 1990, la mise au point de tests de dépistages sanguins qui ont largement limité la transmission du virus par transfusion sanguine.

2. Epidémiologie

Plus de 20 ans après sa découverte, HCV demeure un problème de santé publique. L'infection par HCV est une des causes majeures d'hépatite chronique, de cirrhose du foie et de carcinome hépatocellulaire dans le monde. D'après les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), entre 130 et 150 millions de personnes sont chroniquement infectées par le virus, ce qui correspond à 2-2,5% de la population mondiale (OMS¹). Il existe néanmoins des disparités géographiques. Dans certains pays comme l'Égypte, la

prévalence peut atteindre plus de 10%, alors qu'elle est inférieure à 2,5% dans la plupart des pays d'Europe de l'Ouest et d'Amérique du Nord. Les régions les plus touchées se trouvent en Afrique, en Asie centrale et Asie du Sud-Est et les régions du Pacifique occidental (**Figure 1**) (Lavanchy, 2011).

Chaque année, environ 500 000 personnes meurent de complications liées à l'hépatite C (OMS¹). En France, environ 230 000 cas d'infection chroniques sont répertoriés chaque année ainsi que 2 700 décès liés au virus (INSERM²).

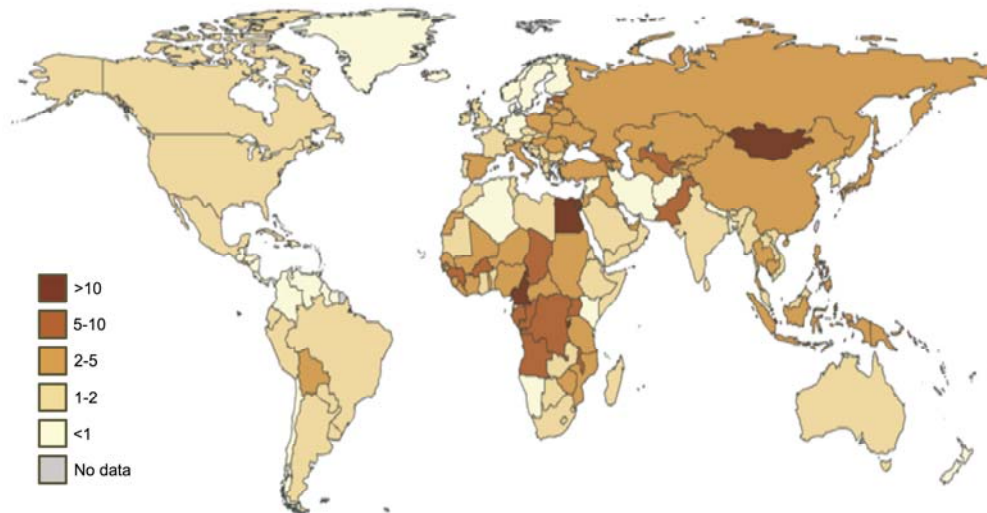


Figure 1. Prévalence mondiale de l'hépatite C en 2010 (%). D'après Lavanchy, 2011.

La prévalence des infections par HCV varie également à travers le monde en fonction des génotypes viraux. HCV présente une très grande diversité génétique. Les analyses des séquences virales et les analyses phylogénétiques en découlant ont permis de répertorier 7 génotypes viraux, dont les séquences nucléotidiques diffèrent de 30 à 35% mais également 67 sous-types confirmés (a, b, c,...) et 20 sous-types hypothétiques (Smith *et al.*, 2013). Le génotype 1 est le plus répandu dans le monde, représentant 46,2% des cas d'infections par HCV. Le second génotype le plus représenté est le génotype 3, avec 30,1% des cas. Les génotypes 2, 4 et 6 sont quant-à-eux responsables de 22,8% des cas. Enfin, le génotype 5 ne représente que moins d'1% des infections par HCV (Messina *et al.*, 2015) (**Figure 2**). A l'heure actuelle, le génotype 7 n'a été détecté que chez quelques patients Centre-Africains (Murphy *et al.*, 2014).

¹ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/fr/>

² <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/hepatite-c>

La distribution géographique actuelle des différents génotypes et sous-types du HCV est complexe. Alors que les génotypes 1, 2 et 3 dominent dans le monde indépendamment du statut économique, les génotypes 4 et 5 sont en majorité présents dans les pays peu industrialisés (**Figure 2**) (Hajarizadeh *et al.*, 2013). Certains sous-types, notamment les sous-types 1a, 1b, 2a et 3a, sont considérés comme les sous-types « épidémiques » car ils sont les plus répandus à travers le globe et sont responsables de la majorité des infections par HCV dans les pays industrialisés. A l’opposé, de nombreux sous-types sont considérés comme sous types « endémiques » car ils sont moins répandus et cantonnés à certaines régions dans le monde. Par exemple, les souches endémiques du génotype 4 sont concentrées en Afrique Centrale et de l’Est, du génotype 5 en Afrique du Sud et du génotype 6 en Asie de l’Est (Hajarizadeh *et al.*, 2013 ; Messina *et al.*, 2015).

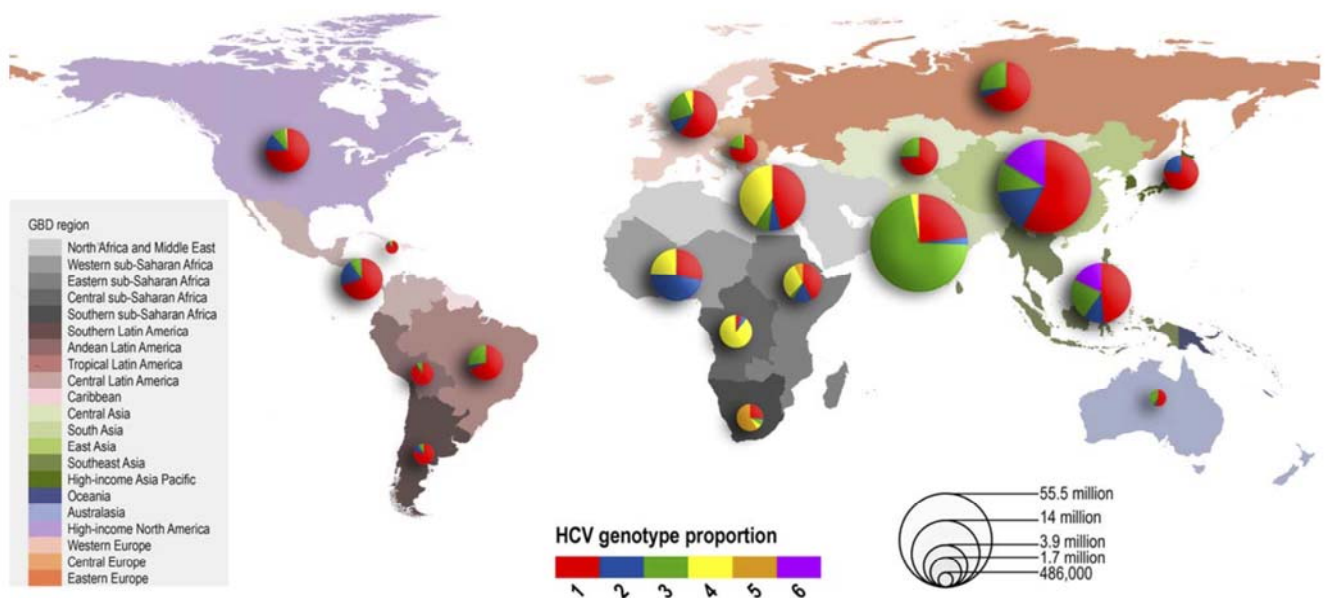


Figure 2. Prévalence relative de chaque génotype du HCV dans le monde. La prévalence relative est exprimée dans chaque région GBD (*Global Burden of Disease*). Le GBD, ou charge mondiale de morbidité, est évalué par l’OMS grâce à un vaste programme mondial, afin de donner une image de l’état de santé mondial. Il est évalué pour plusieurs pathologies, comme l’hépatite C, en combinant le nombre d’années de vie perdues du fait d’une mortalité prématurée et du nombre d’années vécues sans être en pleine santé. Plusieurs pays sont regroupés dans le monde en « région » en fonction de leur GBD. D’après Messina *et al.*, 2015 et l’OMS¹.

Il existe des cas particuliers expliquant la prévalence de certains génotypes. La forte prévalence du HCV en Egypte, ainsi que la prédominance du génotype 4, a une dimension historique. Entre 1964 et 1982, 2 millions d’Egyptiens ont reçu des injections intraveineuses de sels d’antimoine, un composé utilisé à l’époque pour traiter la bilharziose.

La stérilisation insuffisante des seringues ainsi que leur partage furent alors considérés comme responsable de la transmission du HCV. Néanmoins, l'introduction de traitements par voie orale en Egypte n'a pas stoppé la transmission du HCV qui reste multifactorielle dans les pays en développement (Abdel-Ghaffar *et al.*, 2015).

3. Transmission du virus

La transmission du HCV se fait majoritairement par voie parentérale. Avant 1990, la transmission du virus était essentiellement due aux transfusions sanguines et à l'injection de produits dérivés du sang contaminés par le virus. Ce mode de transmission est de nos jours devenu rare en Europe et aux Etats Unis grâce à l'utilisation systématique de tests de dépistages sanguins, mais demeure un problème dans les pays en développement. La contamination peut également avoir lieu lors d'interventions chirurgicales invasives, de chirurgie dentaire ou encore lors de l'utilisation de seringues lorsque de bonnes conditions d'hygiènes ne sont pas respectées (Webster, 2015). L'OMS estime que 2 millions de nouveaux cas d'infection par HCV ont lieu chaque année dans le monde, dus à des pratiques médicales à risque (OMS¹).

De nos jours dans les pays industrialisés, la consommation de drogues par voie intraveineuse avec du matériel contaminé est responsable de près de 2 tiers des nouveaux cas d'infection par HCV. En 2010, il a été estimé que 10 millions d'utilisateurs de drogues par voie intraveineuse (UDI) étaient HCV positifs, soit au total 67% des UDI dans le monde (Nelson *et al.*, 2011). De manière moins importante, il existe un risque de contamination percutanée lors de certaines pratiques; les tatouages, les *piercings*, les rites de scarification, la circoncision ou l'acupuncture peuvent transmettre le virus lorsque les conditions d'hygiènes ne sont pas respectées. Le HCV peut également être transmis par voie per-muqueuse, lors de projection de sang contaminé dans les yeux ou lors d'échange de matériel souillé chez les consommateurs de drogues par voie intranasale (Thomas, 2013). Il existe également un risque de transmission du HCV pour le personnel de santé lors de piqûre avec des seringues ou de coupures avec des objets contaminés. L'incidence de la séroconversion serait toutefois inférieure à 2%. L'exposition d'une peau saine avec le virus ne permet pas sa transmission (MMWR, 2001). Enfin, la transmission de la mère à l'enfant peut avoir lieu dans 3 à 5% des cas. Il n'existe cependant pas de risque de transmission par l'allaitement (Floreani, 2013).

La transmission du HCV par voie sexuelle est quant-à-elle un phénomène rare et controversé. Mais il a été démontré que les risques sont augmentés lors de pratiques agressives entraînant des saignements ou des lésions au niveau des muqueuses génitales, de l'utilisation de drogues ou de stimulants sexuels et en cas de rapports non protégés avec plusieurs partenaires sur une courte période. Il a également été démontré que l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (HIV) augmente considérablement les risques de transmission du HCV (Thome *et al.*, 2010).

II. Histoire naturelle de l'infection par le HCV

L'infection par le HCV est divisée en 2 phases cliniques déterminantes pour l'évolution de la maladie : l'infection aiguë, asymptomatique dans la grande majorité des cas, et l'infection chronique évoluant sur de longues années et pouvant se traduire par le développement de cirrhoses hépatiques et de carcinomes hépatocellulaires. Le foie, principale cible du HCV, est un organe possédant des fonctions vitales nombreuses et variées dans l'organisme. Son dysfonctionnement lors de l'infection par le HCV se répercute donc dans de nombreux processus physiopathologiques.

1. Physiopathologie du foie

Avant de comprendre les mécanismes d'infection par le HCV, il est nécessaire de comprendre la physiologie du foie. Le foie est le plus grand organe interne du corps humain, représentant à lui seul 2% de la masse corporelle totale. Il est composé en majorité de cellules parenchymateuses spécialisées, les hépatocytes (78%), et de cellules non parenchymateuses comme les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales et les cellules stellaires hépatiques (6%). La matrice extracellulaire représente quant-à-elle 16% du volume de l'organe (Ishibashi *et al.*, 2009). Le foie possède une architecture complexe dont l'unité structurale de base est le lobule hépatique. Les lobules hépatiques possèdent une structure hexagonale, traversée en son centre par la veine centrale. Les « angles » de ces lobules sont marqués par la présence d'espace-portes, où sont regroupés une artériole hépatique, une veinule portale et un canal biliaire, ces trois vaisseaux constituant la triade portale (**Figure 3**). Cette particularité remarquable permet aux lobules d'être à la fois irrigués par l'artère hépatique, transportant le sang riche en oxygène, et par la veine porte, transportant le sang enrichi en nutriments absorbés au niveau intestinal. Le sang provenant

de ces deux vaisseaux circule ensuite dans un réseau de capillaires sinusoidaux, entre les travées hépatocytaires, avant de quitter le lobule par la veine centrale qui rejoindra elle-même la veine sus-hépatique (**Figure 3**) (Ishibashi *et al.*, 2009 ; Si-Tayeb *et al.*, 2010). Ces capillaires particuliers possèdent de nombreuses fenestrations et pores permettant au plasma et à de nombreux solutés de circuler librement dans l'espace périnusoïdal ou espace de Disse, ce qui augmente considérablement les échanges entre les hépatocytes et le sang. En parallèle du flux sanguin, les canalicules biliaires permettent la circulation de la bile sécrétée par les hépatocytes vers les canaux biliaires situés au niveau des espace-portes (**Figure 3**). Elle sera excrétée vers la vésicule biliaire et les intestins pour participer à la digestion (Si-Tayeb *et al.*, 2010).

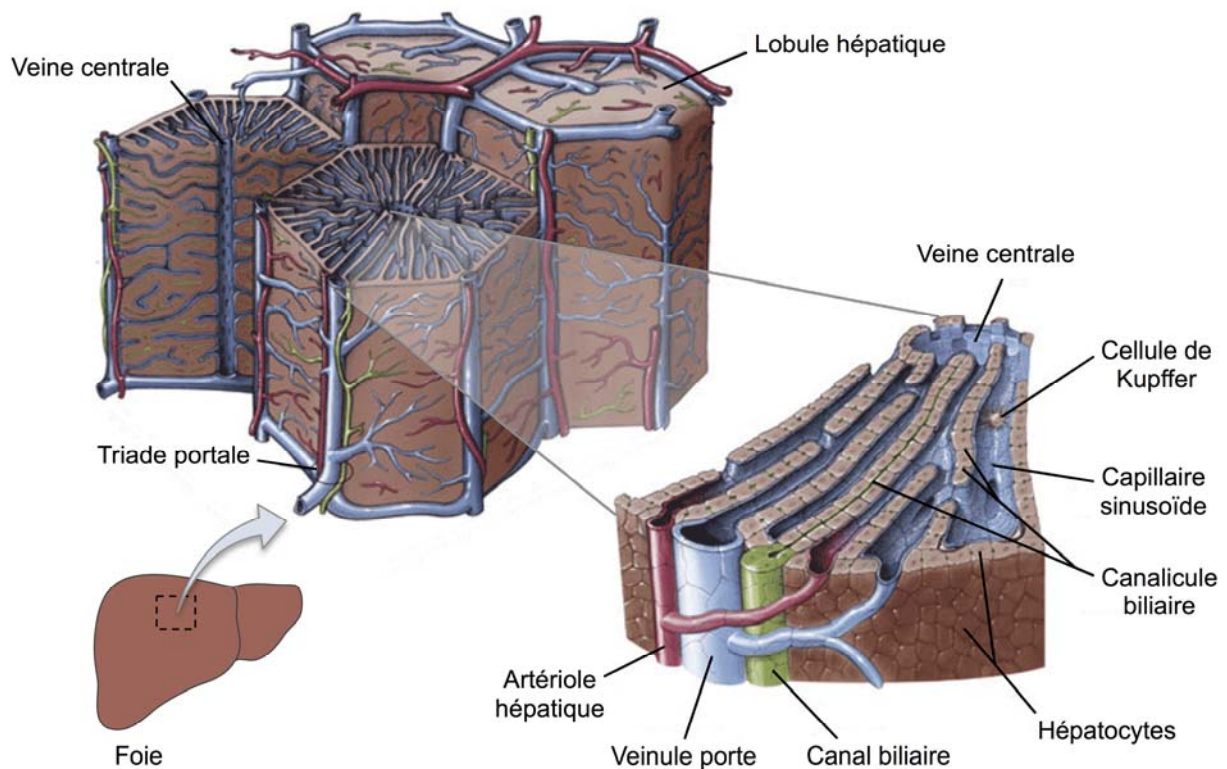


Figure 3. Architecture du foie humain. Le foie est constitué de lobules hépatiques de forme hexagonale. Ils sont composés en majorité de travées hépatocytaires traversées par un réseau de capillaires sinusoidaux convergeant vers la veine centrale, et par des canalicules biliaires rejoignant les canaux biliaires. Les lobules sont bordés par des espace-portes comprenant la triade portale : une artériole hépatique, une veinule porte et un canal biliaire. Figure adaptée de <http://quasargroupconsulting.com/anatomy/liver.php>.

Grâce à son irrigation particulière, le foie reçoit le sang provenant des intestins et joue le rôle de « filtre », en détoxifiant le sang de molécules nocives pour l'organisme telles que l'alcool ou certains médicaments. Le foie joue bien d'autres rôles dans l'organisme. Il

s'agit avant tout d'une glande mixte exhibant à la fois des propriétés endocrines et exocrines. Alors que sa partie exocrine se limite à la production de la bile facilitant la digestion des lipides, ses fonctions endocrines incluent la sécrétion de plusieurs hormones comme par exemple l'angiotensine, impliquée dans la régulation de la pression artérielle, et la thrombopoïétine, stimulant la production des plaquettes. Les hépatocytes produisent également la majorité des protéines plasmatiques telles que l'albumine, les facteurs de coagulation, ou encore certaines protéines de l'inflammation. Enfin, le foie joue un rôle primordial dans la régulation du métabolisme énergétique. D'une part, il constitue l'une des réserves principales de glucose sous forme de glycogène, mobilisable en fonction des besoins de l'organisme. D'autre part, il joue un rôle central dans le métabolisme lipidique ainsi que dans la synthèse et le transport du cholestérol (voir le chapitre « métabolisme des lipoprotéines »). Au total, le foie exerce à lui seul près de 500 fonctions différentes (Ishibashi *et al.*, 2009 ; Si-Tayeb *et al.*, 2010).

2. Evolution de l'infection par HCV

Au vu des nombreuses fonctions du foie, son atteinte par HCV engendre donc de graves complications. L'évolution de l'infection par HCV se fait sur de nombreuses années, en suivant plusieurs étapes résumées dans la **figure 4**.

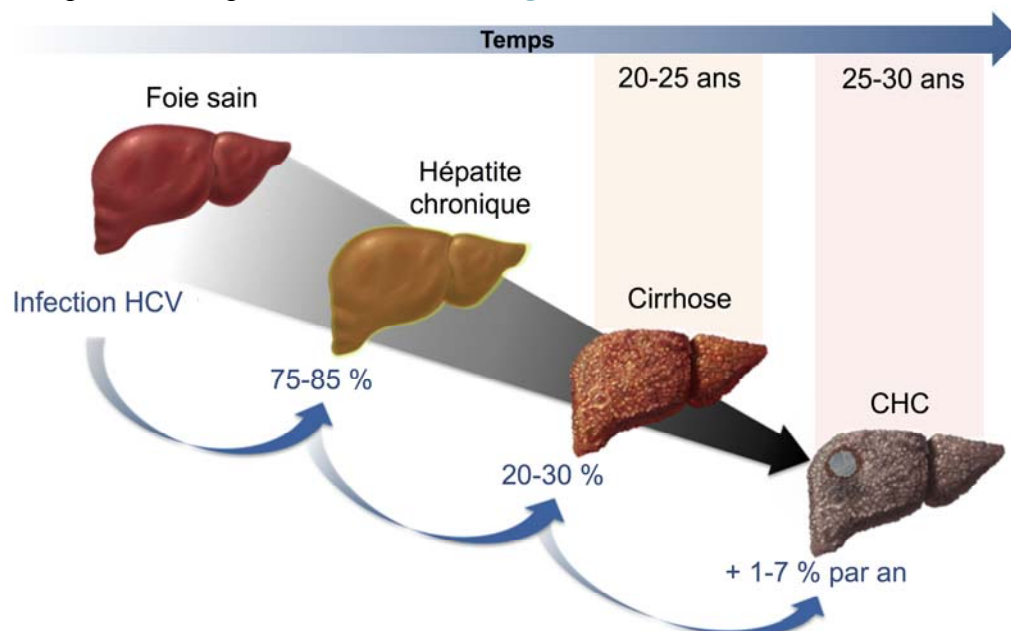


Figure 4. Histoire naturelle de l'infection par HCV. Après l'infection aiguë très souvent asymptomatique, la majorité des patients infectés par HCV (75-85%) développent une hépatite chronique, pouvant évoluer à long terme vers une cirrhose hépatique dans 20 à 30% des cas. Chez les patients atteints de cirrhose, le risque de développer un CHC augmente de 1 à 7% chaque année.

3. Hépatite aiguë

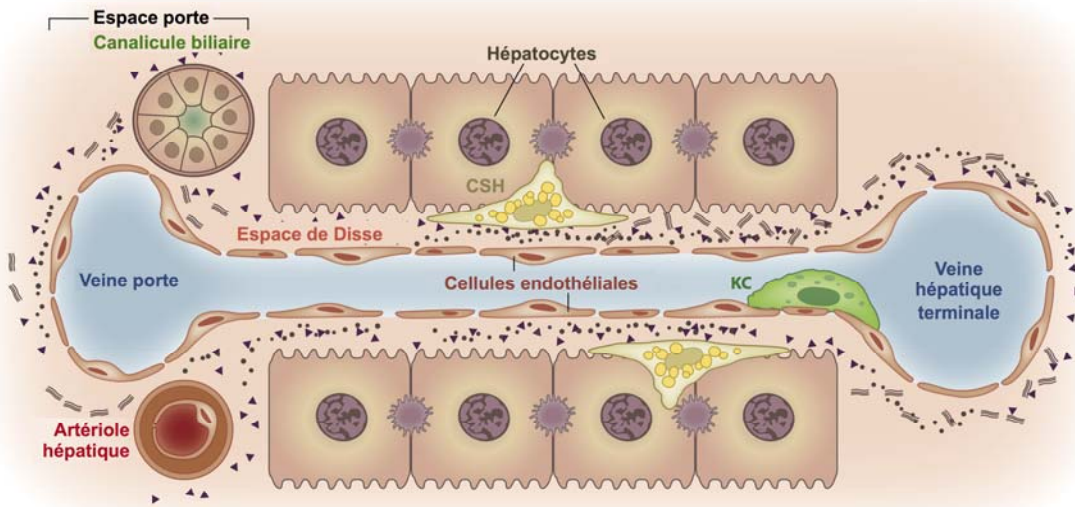
La phase aiguë de l'infection par le HCV est asymptomatique dans 70 à 80% des cas, rendant son diagnostic très difficile (Sagnelli *et al.*, 2014). Certains patients peuvent développer des troubles 2 à 12 semaines après la transmission du virus. Cependant, ces symptômes sont aspécifiques et communs à de nombreuses infections virales (fatigue, nausées, perte d'appétit, fièvre légère ou myalgies) et ne permettent pas d'orienter le diagnostic vers une infection par HCV (Maasoumy et Wedemeyer, 2012). Des symptômes plus spécifiques des hépatites peuvent néanmoins apparaître, comme une jaunisse, des urines foncées, ou des douleurs abdominales. Seules de rares cas d'hépatites fulminantes ont été reportés, comme le très célèbre JFH1 (*Japanese fulminante hepatitis 1*) (Westbrook et Dusheiko, 2014). Entre 15 et 25% des patients infectés par HCV élimineront spontanément le virus durant la phase aiguë et ne développeront pas de séquelles hépatiques à long terme. Cependant, la majorité des patients évolueront vers une hépatite chronique (**Figure 4**) (Maasoumy et Wedemeyer, 2012 ; Westbrook et Dusheiko, 2014).

4. Hépatite chronique : de la fibrose à la cirrhose hépatique

Une fois l'infection chronique établie, l'élimination spontanée du virus est un phénomène très rare. La maladie évolue pendant des années de manière silencieuse. Il n'est pas rare que les patients infectés ne soient diagnostiqués qu'en cas de complications hépatiques graves (Maasoumy et Wedemeyer, 2012). L'infection persistante par HCV est associée à une inflammation chronique et une distorsion de l'architecture normale du foie, conduisant au dysfonctionnement de l'organe. La première étape de la dégénérescence hépatique est la fibrose. Lorsque le foie subit des dommages peu étendus, le processus de cicatrisation, caractérisé par un dépôt localisé de matrice extracellulaire (MEC), est réversible. En cas d'inflammation chronique, le phénomène persiste et le parenchyme hépatique est progressivement remplacé par du tissu cicatriciel. Les cellules stellaires hépatiques (CSH) jouent un rôle central dans le développement de la fibrose en tant que principales productrices de MEC dans le foie. Ces cellules sont suractivées en cas d'inflammation chronique et induisent des dépôts de MEC. Les dépôts de MEC, notamment au niveau de l'espace de Disse, entraînent une perte à la fois des fenestrations des capillaires sinusoides et des microvillosités présentes à la surface des hépatocytes, avec pour conséquence une forte réduction des échanges métaboliques entre le sang et les

hépatocytes (Hernandez-Gea et Friedman, 2011) (**Figure 5**). De manière intéressante, la protéine de capsid Core du virus semble exacerber ce processus (Clement *et al.*, 2010).

a) Foie sain



b) Fibrose hépatique

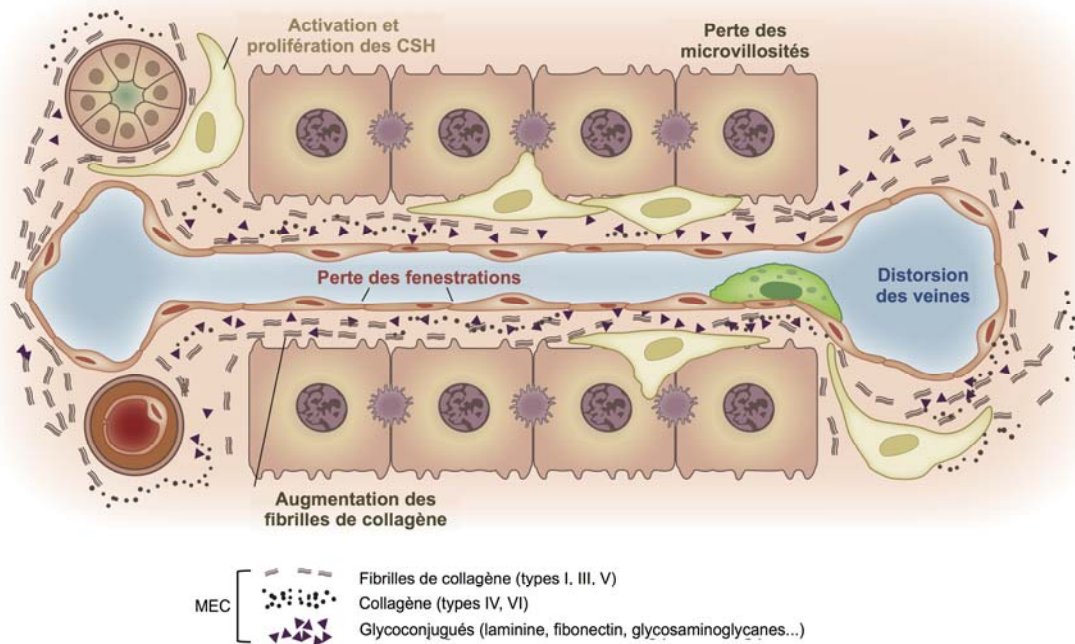


Figure 5. Développement de la fibrose hépatique. (a) Un foie sain est constitué en majorité d'hépatocytes, et de cellules non parenchymateuses comme les cellules de Kupffer (KC) et les cellules stellaires hépatiques (CSH). Les capillaires sinusoidaux sillonnant les travées d'hépatocytes possédant un endothélium avec de nombreux pores et fenestrations. Les fenestrations augmentent considérablement les échanges de métabolites entre le sang et les hépatocytes, captant de nombreuses molécules grâce à leurs microvillosités. L'espace entre les capillaires et les hépatocytes où se déroulent les échanges est l'espace de Disse. (b) En cas d'inflammation chronique du foie, les CSH suractivées produisent de grandes quantités de MEC qui s'accumulent au niveau de l'espace de Disse. Ces dépôts entraînent une perte des microvillosités des hépatocytes et des fenestrations endothéliales, ce qui réduit considérablement les échanges bidirectionnels. Figure adaptée de Hernandez-Gea et Friedman, 2011.

A long terme (20-25 ans), la fibrose mène dans 20 à 30% des cas à la cirrhose hépatique (**Figure 4**) (Wirth et Manns, 2016). Des septa fibreux se forment et isolent le tissu lésé, formant ainsi des nodules de régénération. Très souvent, les septa induisent également une occlusion de la veine porte et une hypertension portale, une des complications majeures de la cirrhose pouvant entraîner des hémorragies. De plus, la cirrhose augmente considérablement les risques de développement du carcinome hépatocellulaire (CHC) (Hernandez-Gea et Friedman, 2011).

5. Hépatite chronique : troubles métaboliques associés


Une particularité histologique associée à l'infection par HCV est la stéatose hépatique. Elle est présente dans 40 à 86% des biopsies hépatiques réalisées chez des patients atteints d'hépatite chronique. La fréquence varie en fonction des génotypes viraux : la stéatose survient dans 73% des infections par le génotype 3 alors que la prévalence se situe aux environs de 50% et moins pour les autres génotypes (Roingeard, 2013).

La stéatose est caractérisée par l'accumulation de lipides, en particulier de triglycérides et de cholestérol, dans le cytoplasme des hépatocytes sous forme de gouttelettes lipidiques. Il s'agit du seul effet cytopathogène direct induit par HCV, en particulier par le génotype 3 (Loizides-Mangold *et al.*, 2014 ; Castera *et al.*, 2015 ; Kralj *et al.*, 2016). Le lien étroit entre HCV et la stéatose s'explique par le fait que le virus détourne le métabolisme lipidique hépatique afin de favoriser son cycle répliatif. La protéine Core, constituant la capsid du virus, est la principale protéine virale impliquée dans le développement de la stéatose (pour revue, voir Roingeard, 2013). Il a notamment été démontré que Core s'accumule à la surface des gouttelettes lipidiques, en interagissant avec une enzyme cellulaire clé de la synthèse des triglycérides, la diacylglycérol acyltransférase ou DGAT1 (Hourieux *et al.*, 2007 ; Herker *et al.*, 2010). L'association Core-gouttelettes lipidiques réduit considérablement leur dégradation et induit une accumulation de lipides dans la cellule, menant à la stéatose. Les virus étant assemblés à la surface des gouttelettes lipidiques, la diminution du *turnover* des gouttelettes lipidiques fait partie intégrante d'une stratégie mise au point par HCV pour se répliquer (Roingeard, 2013). De plus, il a été démontré que la protéine Core diminuait l'activité de la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP), une enzyme impliquée dans la synthèse et la sécrétion des *very low density lipoproteins* (VLDL). Une inhibition de la MTP mène également à l'accumulation de lipides dans la cellule (Perlemuter *et al.*, 2002). Enfin, Core promeut directement la

synthèse de lipides dans les hépatocytes en augmentant la synthèse des *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBP), une famille de facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse (Kim *et al.*, 2007). Chez les patients chroniquement infectés par HCV, la stéatose est également associée à l'insulino-résistance et au diabète de type 2. De plus, elle constitue un facteur de risque supplémentaire menant au CHC, en augmentant le stress oxydatif (Clement *et al.*, 2009).

6. Cancers du foie HCV-induits

Le CHC est le second cancer le plus meurtrier dans le monde, représentant près de 9% des cas de décès par cancer en 2012 selon les données du GLO-BOCAN³ (**voir encadré**). L'infection chronique par HCV est une des causes majeures de CHC dans les pays développés et la première indication pour les transplantations hépatiques. Chaque année, les risques de développer un CHC chez les patients atteints de cirrhose hépatique augmentent de 1 à 7% (**Figure 4**) (Goossens et Hoshida, 2015). Le CHC est multifactoriel et se développe sur de nombreuses années (25 à 30 ans en moyenne). Bien que



Egalité homme-femme ?

Plusieurs études épidémiologiques ont montré que les hommes étaient plus susceptibles au développement du cancer du foie que les femmes (toutes causes confondues). D'après les données du GLO-BOCAN, l'incidence du cancer du foie chez les hommes dans le monde s'élevait à 554 000 cas en 2012 contre 228 000 pour les femmes. Cette tendance s'est confirmée sur les 5 années précédentes : 453 000 cas recensés chez les hommes contre seulement 180 000 pour les femmes. Des études sur modèles animaux ont démontré que cette différence était due aux hormones sexuelles. En effet, la suppression des récepteurs aux androgènes dans les hépatocytes réduit le développement du CHC chez les mâles, suggérant que les androgènes augmenteraient le risque de CHC. De même, d'autres études ont montré que les oestrogènes diminuaient la transformation maligne des hépatocytes. Les oestrogènes protégeraient donc du CHC (Yeh et Chen., 2010 ; Naugler *et al.*, 2016).

l'émergence de nouveaux traitements antiviraux permette d'éliminer efficacement le virus, les risques élevés de développer un CHC perdurent. L'occurrence continue du CHC même après élimination du HCV suggère un effet indirect du virus sur la cancérogenèse (Lemon et McGivern 2012 ; Goossens et Hoshida, 2015). En effet, une étude réalisée sur des biopsies hépatiques provenant de patients atteints de CHC HCV-induits révèle que seule une fraction des hépatocytes malins étaient infectés par HCV (Liang *et al.*, 2009). Le CHC induit par HCV semble donc être dû en majorité à l'environnement inflammatoire et à la fibrose affectant l'architecture du foie à long terme (**Figure 6**) (Wirth et Manns, 2016).

³ <http://globocan.iarc.fr>

En réalité il existe également un deuxième mécanisme par lequel HCV peut induire directement une transformation maligne des hépatocytes infectés (Lemon et McGivern 2012). Certaines protéines virales provoquent des dérégulations du cycle cellulaire et des voies de signalisation cellulaires (**Figure 6**). Un des exemples les plus connus est l'interaction de la protéine virale non structurale 5B (NS5B), correspondant à l'ARN polymérase du virus, avec la *retinoblastoma protein* (Rb). Cette association entraîne la dégradation de Rb par le protéasome. Rb contrôlant le cycle cellulaire et la régulation des dommages causés à l'ADN, sa dégradation massive entraîne une dégénérescence des hépatocytes infectés par HCV. De plus, ce phénomène est amplifié par le stress oxydatif induit par la réponse inflammatoire chronique du foie induisant des dommages de l'ADN (Lemon et McGivern 2012 ; Mitchell *et al.*, 2015). D'autres exemples, comme la suractivation de la voie β -catenin/WNT (anti-apoptotique) ou de la voie des kinases RAF/MAPK/ERK (prolifération cellulaire) par la protéine virale NS5A ont été largement décrits (Goossens et Hoshida, 2015 ; Mitchell *et al.*, 2015). Il existe donc 2 principaux mécanismes de développement du CHC HCV-induit, direct et indirect, qui sont résumés dans la **figure 6**.

7. Manifestations extra-hépatiques

Bien que HCV soit majoritairement hépatotropique, il peut induire des manifestations extra-hépatiques (MEH) chez 1 à 2% des patients infectés chroniquement (Sène *et al.*, 2004 ; Chen et Morgan, 2006). Ces complications affectent considérablement la qualité de vie des patients et la réponse aux traitements. La MEH la plus commune (50% des cas) est la cryoglobulinémie mixte, caractérisée par l'accumulation de cryoglobulines dans le sang et dans d'autres organes. Il s'agit d'immunoglobulines qui deviennent insolubles à 37°C et qui forment des agrégats de haut poids moléculaire. La production de cryoglobulines serait due à une stimulation chronique des lymphocytes B lors de l'infection par HCV (Schamberg et Lake-Bakaar, 2007). Cette maladie est associée à des inflammations des vaisseaux sanguins, des insuffisances rénales, des lésions cutanées et des pathologies auto-immunes comme l'arthrose et le syndrome de Sjören (destruction des glandes salivaires et lacrymales).

Des troubles neurologiques sont également observés chez certains patients infectés chroniquement par HCV. Environ 50% des patients atteints présentent des troubles neuropsychiatriques, des pertes de mémoires et une fatigue intense. La réplication du HCV

dans le cerveau est sujette à controverse. Une étude a suggéré que le virus peut infecter les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, augmentant ainsi sa perméabilité et altérant ses fonctions (Fletcher *et al.*, 2012). De plus, une étude récente réalisée post-mortem sur des cerveaux de patients infectés chroniquement a démontré la présence du HCV dans le cerveau et un lien avec une morphologie vasculaire anormale (Morgello *et al.*, 2014). La présence du virus dans le cerveau pourrait expliquer les troubles neurologiques associés à l'hépatite C chronique.

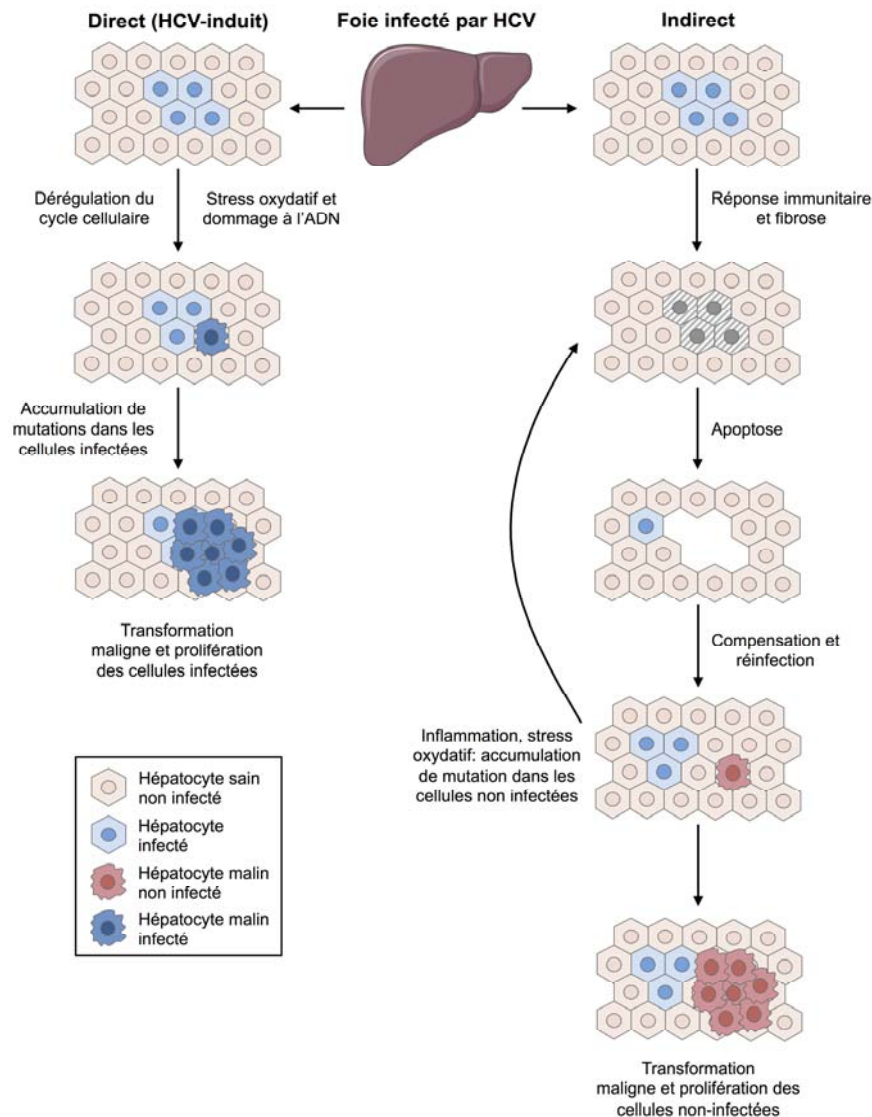


Figure 6. Développement du CHC lors de l'infection par HCV. Deux mécanismes menant au développement d'un CHC ont été décrits. D'une part, il existe un mécanisme direct HCV-induit (gauche). La dérégulation du cycle cellulaire et le stress oxydatif induits par le virus causent des dommages à l'ADN et l'accumulation de mutations. D'autre part, l'environnement inflammatoire et le stress oxydatif déclenchés par l'infection (droite) induisent une mort cellulaire importante et une compensation cellulaire pour réparer les tissus lésés. Les hépatocytes non infectés peuvent alors accumuler des mutations et proliférer. Les 2 scénarii ne sont pas mutuellement exclusifs et sont augmentés en cas de cirrhose hépatique. Figure inspirée de Lemon et McGivern 2012.

III. Réponse immunitaire de l'hôte


L'établissement de la chronicité de l'infection par HCV est dû à plusieurs facteurs viraux et génétiques, et notamment à la faculté d'échappement au système immunitaire du virus. Chez l'Homme, l'introduction d'un élément étranger dans l'organisme déclenche une réponse immunitaire visant à éliminer l'intrus. Lors de l'infection par HCV les réponses immunitaires innées et acquises (humorales et cellulaires) vont s'allier pour enrayer la multiplication du virus. La réponse de l'hôte sera déterminante dans l'évolution de l'infection vers l'élimination ou la persistance du virus.

1. Réponse immunitaire innée anti-HCV

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense antivirale de l'organisme. Les récentes connaissances visant à décrypter les relations entre l'immunité innée et HCV ont révélé des interactions complexes entre les mécanismes de l'hôte visant à stopper la multiplication du virus et les mécanismes mis en jeu par le virus lui-même pour promouvoir sa réplication (Schoggins et Rice, 2013).

a) Mécanisme de défense anti-HCV

Pour détecter les infections par un pathogène, les cellules disposent d'un arsenal de senseurs membranaires et cytoplasmiques reconnaissant une variété de PAMP pour *pathogen-associated molecular patterns*. Ces PAMP sont des motifs spécifiques aux pathogènes reconnus comme du non-soi. Dans le cadre d'une infection virale, il peut s'agir d'acides nucléiques, aussi bien génomiques que les formes intermédiaires de réplication, ou de protéines virales. Les senseurs majeurs, nommés PRR pour *pattern recognition receptors* sont les *toll-like receptors* (TLR) (**voir encadré**), les



Toll story

Au début des années 1980, Christiane Nüsslein-Volhard et Eric Wieschaus entreprirent des cribles génétiques dans le but de découvrir des mutants pour le développement embryonnaire précoce chez la drosophile. E. Wieschaus isola une lignée de drosophile dont les femelles pouvaient pondre des œufs ne pouvant pas se développer. Ces lignées avaient un phénotype très particulier. En les observant, C. Nüsslein s'écria «Toll» (signifiant aussi bien épatant que cool en Allemand). Après plusieurs investigations, il s'avéra que les récepteurs nommés «Toll», dont l'absence donnait chez la drosophile ces phénotypes si particuliers, étaient impliqués dans des cascades de signalisation cellulaires régulant le développement embryonnaire (Reichhart et Imler, 2000). Quelques années plus tard, à Strasbourg, Jules Hoffmann et ses collaborateurs ont découvert que les *Toll receptors* intervenaient également dans l'immunité antifongique chez la drosophile, ce qui lui valut le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2011.

RIG-I-like receptors (RLR) et les senseurs intracellulaires d'ADN viraux (Kawasaki *et al.*, 2011 ; Horner et Gale, 2013). HCV est majoritairement reconnu par les RLR, notamment le *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), quelques heures seulement après l'infection. RIG-I reconnaît des PAMP situés en 5' et 3' des régions non traduites du génome ARN du HCV, qui sont riches en poly-U/UC. Ce motif est reconnu comme du non-soi et déclenche une cascade de signalisation cellulaire et l'activation de l'immunité innée (**Figure 7**). L'activation de RIG-I induit un changement de conformation de la protéine qui exhibe son domaine CARD (*caspase recruitment domain*) lui permettant d'interagir avec la protéine MAVS localisée aux mitochondries (*mitochondrial antiviral signaling protein*, aussi connue sous le nom de CARDIF). La protéine TRIM25 est une protéine chaperonne essentielle qui permet la translocation de RIG-I vers MAVS. L'interaction RIG-I/MAVS déclenche l'activation de molécules effectrices et des facteurs de transcription IRF-3 et IRF-7 (*interferon regulatory factor-3/7*) et de NF- κ B (nuclear factor κ B). Cette cascade de signalisation mène à la production d'interférons (IFN) de type I (α , β) et III (λ) et de cytokines pro-inflammatoires. Les IFN produits par les cellules infectées sont sécrétés et agissent de manière autocrine et paracrine *via* la voie de signalisation JAK/STAT (*Janus kinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription*) (**Figure 7**). Ils induisent ainsi la transcription de près de 400 ISG (*IFN stimulated genes*) ayant des propriétés antivirales et permettant de contrôler de manière synergique la réplication virale (Horner et Gale, 2013). De manière intéressante, la lignée cellulaire dérivée d'hépatocarcinome humain Huh7.5.1 (voir chapitre « Modèles d'étude du HCV »), déficiente pour la signalisation RIG-I-dépendante, permet une forte réplication du HCV *in vitro*, démontrant l'importance de RIG-I dans la réponse anti-HCV (Schoggins et Rice, 2013).

Pendant longtemps, RIG-I a été considéré comme l'acteur majeur de la réponse anti-HCV. Récemment, une étude a démontré que MDA5 (*Melanoma differentiation-associated protein 5*), un autre senseur de la famille des RLR, jouait également un rôle primordial dans la réponse IFN lors d'une infection par HCV. MDA5, tout comme RIG-I, contient un domaine CARD et peut interagir avec MAVS pour induire la production d'IFN de type I et III. MDA5 est activé par les longs ARN double brin cytoplasmiques (ARNdb) et peut donc reconnaître les formes répliquatives des virus à ARN comme HCV (Cao *et al.*, 2015). RIG-I et MDA5 pourraient donc agir de concert pour lutter contre l'infection par HCV, comme cela a été décrit pour d'autres virus de la même famille (virus de la dengue, virus *West Nile* ou virus de l'encéphalite japonaise) (Schoggins et Rice, 2013).

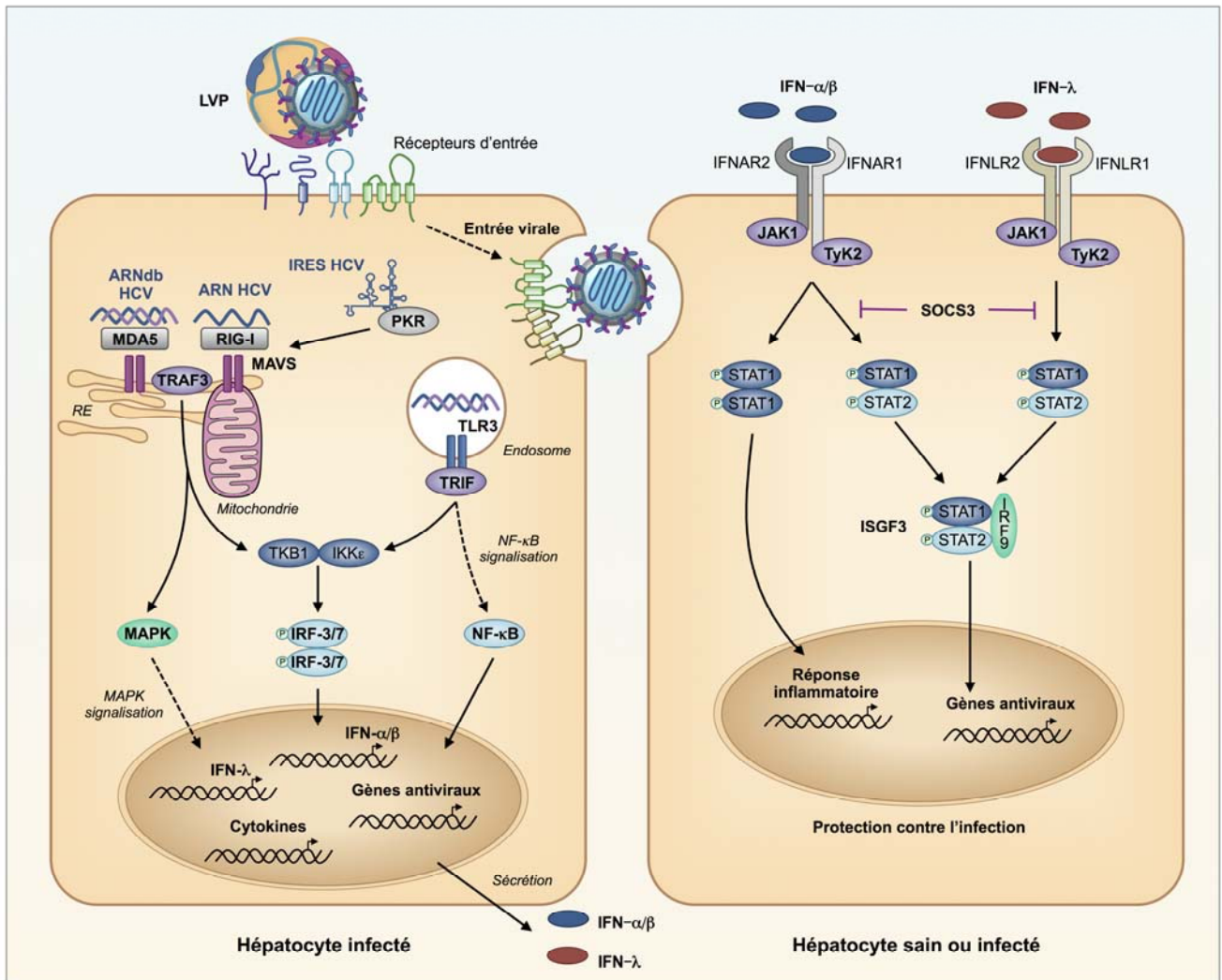


Figure 7. Réponse immunitaire innée anti-HCV. **Panel de gauche :** HCV infecte les hépatocytes en interagissant avec plusieurs récepteurs cellulaires. La cellule détecte l'infection virale grâce à l'action combinée de RIG-I et MDA5, reconnaissant respectivement le génome ARN du virus et la forme répliquative ARNdb dans le cytoplasme. TLR3 reconnaît la forme ARNdb répliquative dans les endosomes. La PKR est un senseur non conventionnel reconnaissant l'IRES du HCV. MDA5, RIG-I (et la PKR dans une moindre mesure) activent la protéine adaptatrice MAVS en interagissant par leur domaine CARD, au niveau des mitochondries et des membranes associées. La protéine TRAF3 propage le signal jusqu'à l'activation d'IRF-3 et IRF-7 et de la voie des MAPK. La signalisation TLR3 passe par l'activation de la protéine adaptatrice TRIF qui mène à l'activation d'IRF3-7 et de la voie NF- κ B. L'ensemble de ces mécanismes permet l'expression des gènes de l'IFN de type I (α et β) et III (λ), des gènes antiviraux et de cytokines pro-inflammatoires. **Panel de droite :** les IFN de type I et III sont sécrétés et interagissent avec leur récepteur respectif, pour activer les kinases JAK1 et TYK2, conduisant à la phosphorylation de STAT1 et STAT2. STAT1 peut former un homodimère pour activer la réponse inflammatoire. Il peut également former un hétérodimère avec STAT2 et s'associer à IRF9 pour former le facteur de transcription ISGF3 activant l'expression des gènes antiviraux. De nombreux mécanismes de régulation des voies IFN existent. L'activation du facteur SOCS3, un inhibiteur de la phosphorylation de STAT1, en est un exemple. LVP, lipo-viro-particule ; IKK ϵ , I κ B kinase- ϵ ; TBK1, *TANK-binding kinase 1* ; TRAF3, *tumor necrosis factor receptor-associated factor 3* ; IFNAR, *IFN- α/β receptor* ; IFNLR, *IFN- λ receptor* ; SOCS3, *suppressor of cytokine signaling 3* ; IRF9, *IFN regulatory factor 9* ; ISGF3, *IFN-stimulated gene factor 3*.

Le TLR3 a été décrit comme un PRR également capable de détecter une infection par HCV (**Figure 7**). Cependant, son rôle exact est encore peu connu. Le TLR3 est un senseur endosomal reconnaissant l'ARNdb dans plusieurs types cellulaires dont les hépatocytes et les cellules de Kupffer. Le signal est propagé dans la cellule grâce à la protéine adaptatrice TRIF (*TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β*) qui active IRF-3, NF- κ B et la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) afin de produire l'IFN de type I et des cytokines pro-inflammatoires (Horner et Gale, 2013). L'activation du TLR3 par HCV est tardive (3-4 jours après l'infection). Ce phénomène s'explique par le fait que le TLR3 reconnaît la forme répliquative ARNdb du HCV qui s'accumule tardivement après l'entrée du virus (Li *et al.*, 2012). De plus, les TLR3 peuvent être activés après endocytose des formes ARNdb extracellulaires, provenant des cellules mortes *via* les *scavenger* récepteurs (Dansako *et al.*, 2013). Cette activation tardive pourrait permettre une seconde vague de réponse immunitaire innée après l'activation initiale de RIG-I. Cependant, la production de cytokines pro-inflammatoires TLR3-dépendante pourrait également jouer un rôle dans la progression de la fibrose lors de l'infection chronique par HCV (Horner et Gale, 2013 ; Su-Hyung et Rehermann, 2014).

Enfin, il a été démontré que la protéine kinase R (PKR), initialement décrite comme une ISG à large spectre antiviral, pouvait être un senseur non conventionnel du HCV (**Figure 7**). En effet, la PKR peut se lier à l'IRES (*internal ribosome entry site*) présent en 5' du génome viral, qui est très structuré et qui mime un ARNdb. La PKR activée peut ainsi induire la voie MAVS/IRF-3 indépendamment de RIG-I (Arnaud *et al.*, 2011 ; Su-Hyung et Rehermann, 2014).

b) Contre attaque virale : voler sous le radar

Une infection aiguë par HCV peut être éliminée spontanément par une réponse immunitaire efficace. Malheureusement, dans 80% des cas, l'immunité innée et les systèmes de détection du virus ne permettent pas de contrôler sa dissémination car le virus a développé des mécanismes d'évasion à l'immunité innée. Cette observation explique que la majorité des patients infectés par HCV évoluent vers une hépatite C chronique (pour revue, voir Horner et Gale, 2013 ; Schoggins et Rice, 2013). La stratégie principale du virus consiste à inhiber les systèmes de détection des infections virales (**Figure 8**). D'une part, la protéase virale NS3/NS4A joue un rôle central dans ce processus en clivant les protéines adaptatrices MAVS et TRIF, inhibant ainsi la voie de signalisation de RIG-I et

du TLR3 respectivement (Meylan *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2005). D'autre part, la protéine virale NS5A interagit directement avec la PKR et inhibe la réponse cellulaire induite par la PKR (Gale *et al.*, 1997 ; Taylor *et al.*, 1999). Ces mécanismes diminuent fortement la production d'IFN.

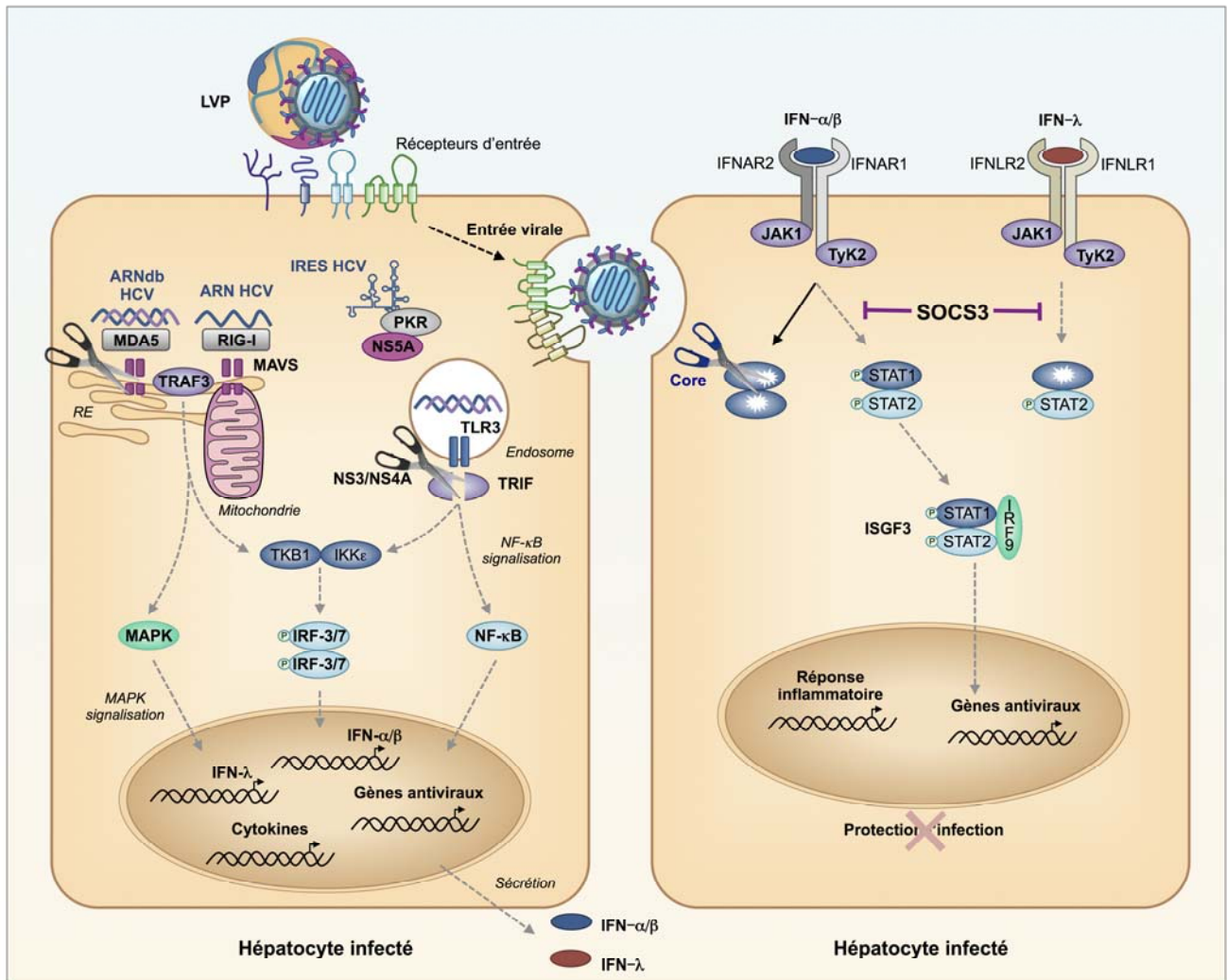


Figure 8. Mécanisme de contre-attaque virale. Panel de gauche : HCV peut bloquer les systèmes cellulaires détectant une infection virale en clivant les facteurs MAVS et TRIF par l'action de la protéase virale NS3/NS4A. De plus NS5A inhibe la réponse cellulaire induite par la PKR. La production d'IFN est donc fortement diminuée. **Panel de droite :** HCV est également capable d'inhiber la réponse à l'IFN en induisant la dégradation de STAT1 via la protéine de capsid core. De plus, HCV augmente l'expression de SOCS3 qui inhibe la phosphorylation de STAT1.

Historiquement les thérapies anti-HCV étaient basées sur l'utilisation de l'IFN-α pegylé (voir le chapitre « Diagnostic et traitements »). Néanmoins la réponse à l'IFN peut s'avérer peu efficace chez certains patients infectés chroniquement par HCV. Là encore, le virus a développé des stratégies pour contrecarrer la réponse à l'IFN. Il a été démontré que la protéine de capsid core pouvait inactiver la voie JAK/STAT (Figure 8) d'une part en

induisant la dégradation de STAT1 (Lin *et al.*, 2005), et d'autre part en induisant l'expression de SOCS3, un inhibiteur naturel de la voie JAK/STAT (Bode *et al.*, 2003).

2. Réponse immunitaire adaptative anti-HCV


La seconde ligne de défense de l'organisme est l'immunité adaptative. Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative est spécifique de l'agent infectieux rencontré. La réponse immunitaire dirigée contre HCV inclut la production d'anticorps neutralisants, provenant de la réponse humorale, et les lymphocytes T (LT) CD4⁺ et CD8⁺ permettant une réponse cellulaire spécifiquement dirigée contre le virus.

a) Réponse humorale : rôle des anticorps neutralisants

Durant les premières phases de l'infection par HCV, les patients immunocompétents développent des anticorps spécifiquement dirigés contre le virus. Cependant, la plupart des anticorps produits contre HCV n'ont pas d'activité antivirale. Seule une partie des anticorps anti-HCV peut inhiber l'entrée du virus dans les hépatocytes et ainsi contrôler la dissémination du virus. Ces anticorps sont nommés anticorps neutralisants (ou *neutralizing antibodies*, *nAbs*) (pour revue, voir Neumann-Haefelin et Thimme, 2013 et Park et Rehmann, 2014).

L'étape d'entrée du virus dans les hépatocytes constitue une cible de choix pour les nAbs. Les nAbs agissent à plusieurs niveaux : ils peuvent inhiber l'attachement du virus, empêcher les interactions virus-facteurs d'entrée, bloquer l'endocytose des particules virales et cibler les épitopes nécessaires à la fusion de l'enveloppe virale avec les endosomes (Barth *et al.*, 2006 ; Zeisel *et al.*, 2007 ; Sabo *et al.*, 2011). Les cibles principales des nAbs sont les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. Il existe peu d'études sur les nAbs ciblant E1 qui semble être moins immunogène qu'E2 (Meunier *et al.*, 2008 ; Fournillier *et al.*, 2011). Les épitopes ciblés sont localisés en grande majorité dans les régions hypervariables d'E2. Un épitope immunodominant a notamment été décrit dans la région hypervariable HVR1, pouvant varier de 80% entre les différents génotypes et sous-types du HCV (Von Hahn *et al.*, 2007 ; Prentoe *et al.*, 2011 Fafi-Kremer *et al.*, 2012). Les nAbs ciblant HVR1 ne possèdent donc pas d'activité neutralisante croisée (Vieyres *et al.*, 2011). D'autres épitopes sont situés au niveau des domaines de liaison au CD81 et sont relativement conservés entre les génotypes. Ils présentent ainsi des capacités de neutralisation croisée (Keck *et al.*, 2008 ; Law *et al.*, 2008).

Bien que plusieurs études aient démontré l'activité antivirale des nAbs *in vitro*, leur pouvoir neutralisant *in vivo* est mal connu. Les premières évidences démontrant le rôle des nAbs viennent d'études réalisées sur les chimpanzés où l'immunisation des animaux par les glycoprotéines d'enveloppe avaient un



Souche AD78

Entre 1978 et 1979 en Allemagne de l'Est, plus de 3000 femmes Rhésus négatives ont été contaminées par une même souche virale du HCV, suite à l'injection d'immunoglobulines anti-D pour éviter l'auto-immunisation contre le facteur Rhésus après un accouchement. Les préparations d'anticorps étaient contaminées par une souche virale unique, la souche AD78. Cette cohorte a depuis été très étudiée (Wiese *et al.*, 2014).

rôle partiellement protecteur contre l'infection par HCV (Farci *et al.*, 1994). En 2007, l'importance des nAbs dans l'élimination du virus a été démontrée chez l'Homme par une étude réalisée sur des patients infectés par une même souche virale connue du HCV, la souche AD78 (géntotype 1b) (**voir encadré**). Dans cette étude, la clairance virale a pu être corrélée à une production précoce de nAbs, alors que les infections persistantes étaient associées à une production retardée des nAbs (Pestka *et al.*, 2007). Le rôle des nAbs chez les patients chroniquement infectés par HCV reste cependant sujet à controverse (pour revue, voir Zeisel *et al.*, 2007 et Fafi-Kremer *et al.*, 2012).

b) Evasion virale aux nAbs

Plusieurs mécanismes mis en jeu par le virus contribuent à l'évasion du HCV aux nAbs. Une caractéristique majeure des virus à ARN comme HCV est leur grande variabilité génétique due à l'absence d'activité correctrice, ou *proof reading*, de l'ARN polymérase ARN dépendante virale (une erreur environ tous les 1000 nucléotides), couplée à une production de particules virales très élevée (10^{10} à 10^{12} virions par jour chez les patients infectés chroniquement par HCV) (Di Lorenzo *et al.*, 2011). Il existe donc une population de variants très hétérogènes du HCV chez un même patient. Ces variants sont nommés quasi-espèces (Di Lorenzo *et al.* 2011). Il a été démontré que les régions hypervariables HVR1 des glycoprotéines d'enveloppe évoluent beaucoup plus rapidement que le reste du génome viral (Kurosaki *et al.*, 1993). Les mutations dans ces régions ciblées par les nAbs sont responsables de l'évasion du HCV aux nAbs. En effet, très rapidement l'anticorps neutralisant ne reconnaît plus la protéine virale mutée. De plus, les mutants délétés des régions HVR1 sont beaucoup plus sensibles aux nAbs, suggérant que les régions HVR1 jouent un rôle de leurre pour le système immunitaire en masquant des structures très conservées des glycoprotéines d'enveloppe sensibles aux nAbs (Forns *et al.*, 2000 ;

Mondelli *et al.*, 2001 ; Prentoe *et al.*, 2011). De même, les nombreuses glycosylations retrouvées à la surface d'E1 et E2 rendent difficile l'accès des épitopes aux nAbs (Von Hahn *et al.*, 2007 ; Prentoe *et al.*, 2011 Fafi-Kremer *et al.*, 2012). Certaines mutations situées dans les domaines de liaison aux récepteurs d'entrée comme le CD81 peuvent aussi contribuer à l'évasion du HCV au système immunitaire. De manière intéressante, ces mutants échappent au nAbs par une utilisation altérée des facteurs d'entrée (Fofana *et al.*, 2012).

Un autre mécanisme permettant d'échapper aux nAbs est la transmission directe du HCV de cellule-à-cellule. En effet, par ce mode de transmission, le virus peut être disséminé dans le foie sans entrer en contact avec les nAbs présent dans l'espace extracellulaire. L'importance de la transmission cellule à cellule et de l'échappement aux nAbs dans la persistance du virus a également été mise en évidence lors de la transplantation hépatique (TH). Malgré la présence de nAbs, la réinfection du greffon a lieu dans les quelques heures suivants la TH. Parmi les variants viraux présents avant TH, seule une fraction est sélectionnée et va pouvoir se multiplier dans le greffon. Les variants sélectionnés sont caractérisés par une capacité d'entrée plus efficace dans les hépatocytes et un meilleur échappement aux nAbs homologues (Schvoerer *et al.*, 2007 ; Fafi-Kremer *et al.*, 2010).

Enfin, l'association du virus avec les lipoprotéines de l'hôte contribue à l'échappement aux nAbs. En effet, le virus circule majoritairement en association avec des lipoprotéines de type VLDL ou LDL (*low density lipoproteins*) pour former une lipo-viro-particule (LVP) infectieuse. Cette association pourrait protéger le virus en masquant les épitopes viraux et en facilitant l'entrée virale, limitant ainsi l'exposition aux nAbs (Bartosch *et al.*, 2005 ; Fafi-Kremer *et al.*, 2012). Le rôle des lipoprotéines dans l'échappement du HCV aux nAbs reste peu documenté. **L'étude de ce mécanisme a constitué, une partie de ce travail de thèse (voir Fauvelle*, Felmler*, Crouch *et al.*, *Gastroenterology*, 2016).**

c) Les cellules dendritiques: lien entre les réponses innée et adaptative

L'immunité cellulaire anti-HCV est un processus hautement régulée et nécessitant la coopération de plusieurs cellules. Les premiers acteurs sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les cellules dendritiques (ou *dendritic cells*, DC). Ces cellules permettent un lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Lorsqu'elles rencontrent un agent pathogène comme HCV, les DC sont activées et en conséquence


surexpriment des molécules clés de l'immunité : les HLA de type I et II (*human leukocyte antigen*) et les molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des LT (par exemple les récepteurs B7 et CD40) ainsi que certaines cytokines ou chimiokines permettant la communication intercellulaire (par exemple l'interleukine 12 ou IL12 permettant la différenciation des LT CD4⁺ en LT *helper* de type 1). Les DC activées migrent dans les ganglions lymphatiques et présentent les antigènes aux cellules effectrices de l'immunité adaptative : elles activent les LT CD4⁺ *via* l'interaction HLA II-TCR (*T cell receptor*) et les LT CD8⁺ par l'interaction HLA I-TCR.

Il existe deux types principaux de DC : les DC myéloïdes considérées comme des CPA « professionnelles » activatrices des LT naïfs et sécrétrices d'IL-12 et les DC plasmacytoïdes, moins efficaces dans la présentation d'antigènes mais grandes sécrétrices d'IFN de type I et II (Spaan *et al.*, 2012 ; Neumann-Haefelin et Thimme, 2013). Lors d'une infection par HCV, il a été démontré que la présentation d'antigènes aux LT CD4⁺ par les DC myéloïdes ainsi que leur capacité à sécréter de l'IL-12 était entravée par plusieurs protéines virales (Ryan et O'Farrelly, 2011). De plus, il a été observé une diminution du nombre de DC plasmacytoïdes dans le sang des patients infectés chroniquement par HCV ainsi qu'une diminution de leur capacité à produire de l'IFN- γ (Ryan et O'Farrelly, 2011). En ciblant les DC, le virus peut ainsi bloquer le lien entre les réponses innée et adaptative. Il est également important de noter que les DC sont des cellules permissives au HCV et peuvent ainsi constituer un réservoir et contribuer à sa dissémination (Lambotin *et al.*, 2010).

d) Réponse cellulaire : rôle des LT

Les LT CD4⁺ et CD8⁺ jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection par HCV. La phase aiguë de l'infection est caractérisée par une très forte réponse des LT contre les cellules infectées. Plusieurs études ont démontré la corrélation entre l'apparition des LT spécifiques du HCV et le déclin de la charge virale (Lechner *et al.*,

2000). Des études réalisées sur les chimpanzés ont montré qu'une baisse du nombre de LT CD4⁺ est associée à une persistance de l'infection et à l'apparition de variants échappant



Un peu de poésie

Lorsqu'un LT CD8⁺ cytotoxique interagit par contact direct avec une cellule infectée, il lui donne le fameux « baiser de la mort ». Ce baiser mortel correspond à une décharge de perforines et de granzymes. Les perforines forment des pores dans les membranes des cellules infectées et permettent l'entrée des granzymes qui déclenchent ainsi l'apoptose et la mort des cellules (Trambas et Griffiths, 2003).

aux LT CD8⁺ (Grakoui *et al.*, 2003). De même, une baisse du nombre de LT CD8⁺ induit une persistance du virus (Shoukry *et al.*, 2003). Ces études supportent le fait que les LT CD8⁺ sont les effecteurs principaux de la réponse cellulaire contrôlant l'infection virale et que les LT CD4⁺ ont des fonctions « *helper* » permettant de prévenir l'apparition de virus résistants aux LT CD8⁺. Les LT CD8⁺ spécifiques du HCV exercent leur activité antivirale par deux mécanismes principaux. D'une part, certains ont une activité cytotoxique et induisent l'apoptose des cellules infectées par le virus (**voir encadré**). D'autre part, d'autres LT CD8⁺ contribuent au contrôle de la réplication du virus en produisant des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ et le TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) (pour revue voir Neumann-Haefelin et Thimme, 2013).

e) Echappement du HCV à la réponse des LT

En dépit de l'efficacité de la réponse des LT contre HCV, certains variants viraux peuvent contourner leur action. Lors de la présentation d'un épitope par une CPA, le l'antigène reconnu est mûri par la cellule, se lie aux HLA de type I ou II et est présenté à la surface de la cellule pour être reconnu par les LT. La forte variabilité génétique des quasi-espèces peut mener à des mutations de ces épitopes antigéniques normalement reconnus par les LT. Plusieurs mécanismes sont possibles. La mutation peut entraîner une dissociation peptide-HLA dans la cellule et une perte de la présentation de l'antigène. La mutation peut également entraver le processus de protéolyse du peptide et entraîner sa destruction plutôt que sa présentation. Enfin, les peptides présentés peuvent lier les HLA mais la reconnaissance par les LT peut être réduite ou altérée par rapport au peptide d'origine (Bowen and Walker 2005). Des études réalisées chez les patients infectés par HCV ont démontré que l'apparition de variants échappant à la réponse des LT corrélait avec la persistance du virus. De plus, ces variants ne sont pas détectés chez les patients éliminant le virus en phase aiguë, indiquant que l'échappement aux LT constitue un mécanisme menant à la chronicité de l'infection (Neumann-Haefelin et Thimme, 2013).

Il a également été observé que les fonctions des LT CD8⁺ en elles-mêmes étaient affectées indépendamment de l'échappement viral. La réponse des LT est généralement très forte durant la phase aiguë de l'infection par HCV mais se trouve très affaiblie durant la phase chronique. Il s'agit du phénomène d'épuisement des cellules T. En effet, l'exposition continue à des niveaux élevés d'antigènes viraux conduit à une perte progressive des fonctions des LT. Les cellules perdent dans un premier temps leur capacité

de prolifération, puis de production de certaines cytokines comme l'IL-2, et dans certains cas avancés, la production d'IFN- γ est également abolie. L'état d'épuisement est aussi caractérisé par une forte expression des récepteurs de mort programmée PD-1 (*receptor programmed cell death 1*) à la surface des LT CD8⁺ spécifiques du HCV, induisant une forte apoptose de ces cellules (Wherry, 2011).

Enfin, les cellules T régulatrices (T_{regs}) et les cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- β contribuent également à la persistance du virus en inhibant les fonctions des LT effecteurs (Alatrakchi et Koziel, 2009). En effet, une forte augmentation des T_{regs} a été observée chez les patients infectés chroniquement par HCV. Ces cellules peuvent être fortement activées par les protéines du HCV, comme Core, ou par le TGF- β

f) Implications pour la recherche vaccinale

A l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin pour prévenir des infections par HCV. La grande variabilité génétique du virus et l'ingéniosité des mécanismes d'échappement au système immunitaire menant à la chronicité de la maladie font de l'élaboration d'un vaccin un vrai challenge. Grâce aux nouvelles connaissances sur l'immunité anti-HCV, de nouveaux facteurs pourront être pris en compte pour la production d'un vaccin efficace. La restauration de la fonction des LT CD8⁺ (par exemple en inhibant les récepteurs PD-1) couplée à une réponse suffisante des LT CD4⁺ *helper* s'avère être un concept prometteur (Baumert *et al.*, 2014). En attendant, la lutte contre HCV reste basée sur l'amélioration des techniques de diagnostic et sur l'élaboration de traitements curatifs efficaces.

IV. Diagnostic et traitements

1. Marqueurs de l'infection virale et méthodes de diagnostic

L'infection aiguë est caractérisée par l'apparition d'une virémie positive (1 à 2 semaines après infection) et d'une très forte augmentation des taux d'ALAT (alanine aminotransférase) sériques, jusque 10 fois supérieur aux normes (**Figure 9A**). Il s'agit d'une enzyme de la famille des transaminases présente en très grande quantité dans les hépatocytes. Une forte présence d'ALAT dans le sang témoigne donc d'une dégradation massive des hépatocytes. La séroconversion, c'est-à-dire l'apparition d'anticorps anti-HCV, n'apparaît qu'environ 8 semaines après contact avec le virus. (Chen et Morgan, 2006 ; Chevaliez, 2011). Six mois après l'infection, la persistance de l'ARN viral dans le sang indique le passage en phase chronique de la maladie. Elle est caractérisée par une forte

virémie et des taux d'ALAT supérieurs aux normes, mais cependant bien moins élevés qu'en phase aiguë (**Figure 9B**). Après séroconversion, les anticorps anti-HCV persisteront à vie chez les patients infectés chroniquement (Chen et Morgan, 2006 ; Chevaliez, 2011). Il est à noter que la présence d'anticorps anti-HCV dans le sang n'est pas nécessairement indicative de la maladie. En effet, ils peuvent témoigner d'une infection passée résolue, les anticorps anti-HCV pouvant être détectés jusque 10 ans après élimination du virus (Maasoumy et Wedemeyer, 2012). Ainsi, la détection de l'ARN viral (virémie), couplée à la mesure des taux d'anticorps anti-HCV et des marqueurs hépatiques comme l'ALAT, sont indispensables au bon diagnostic de la maladie.

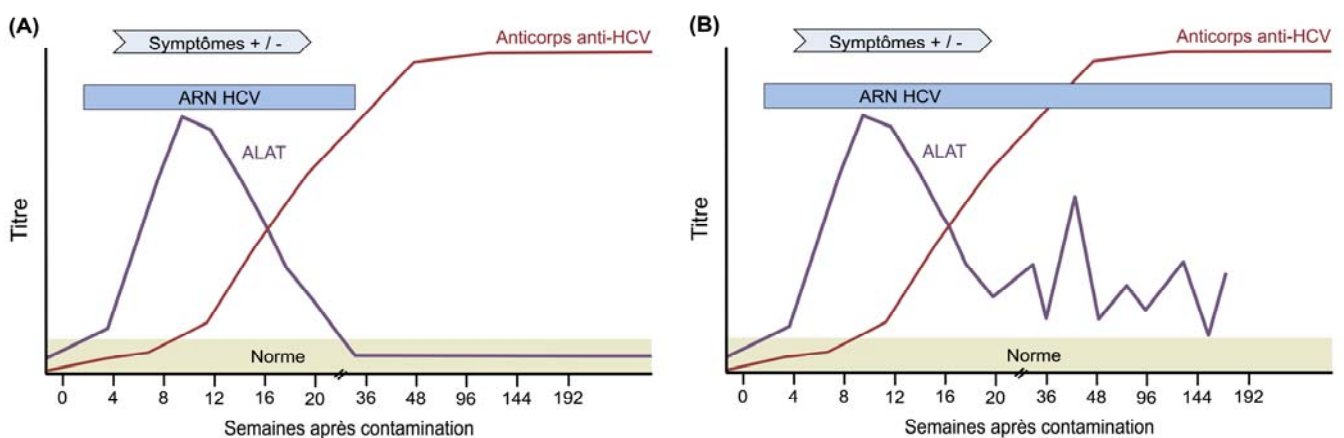


Figure 9. Evolution des marqueurs virologiques durant une infection HCV aiguë résolutive (A) et une infection HCV chronique (B). Figure adaptée de Chevaliez, 2011.

En routine, les taux d'anticorps anti-HCV sont déterminés par l'utilisation de test EIA, pour *enzyme immunoassays*, en « sandwich ». Le principe repose sur la capture des anticorps à l'aide d'antigènes spécifiques des protéines virales (core, NS3, NS4B et NS5A pour les kits de 3^e génération). Ils sont ensuite détectés grâce à des anticorps anti-isotype humains couplés à une enzyme qui, mise en présence de son substrat, donnera un produit coloré. L'ARN viral est quant-à-lui détecté et mesuré par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR, *Real Time-quantitative Polymerisation Chain Reaction*) (Chevaliez, 2011). D'autres marqueurs virologiques peuvent également être utilisés comme la détection de la protéine virale Core par des techniques immunologiques. Il a été démontré que les taux de protéine Core sont proportionnels aux taux d'ARN viraux. La quantification de cette protéine pourrait constituer une alternative à la quantification de l'ARN du HCV car elle se révèle moins coûteuse, plus facile à mettre en œuvre et moins sujette aux faux positifs. Cependant, les techniques de détection de Core sont moins sensibles que les méthodes

d'amplification de l'ARN. Elles pourraient donc être mise en œuvre préférentiellement pour quantifier les titres viraux chez les patients traités pour une hépatite chronique afin de suivre la réponse au traitement. Enfin, la détermination du génotype viral par séquençage est primordiale avant la mise en place d'une thérapie car il détermine les doses et les durées du traitement (Chevaliez, 2011).

2. Les traitements anti-HCV : aux armes etc...

Depuis plus de 10 ans, le traitement standard pour les infections chroniques par HCV était basé sur la combinaison de l'interféron α (IFN- α) pégylé et de la ribavirine, un analogue nucléosidique à large spectre antiviral. La durée du traitement se situait entre 24 et 72 semaines en fonction des patients, de leur génétique (**voir encadré**) et de leurs antécédents mais aussi en fonction du génotype viral. Les infections chroniques par le génotype 1, le génotype le plus agressif, nécessitent notamment des traitements de plus longue durée que les autres génotypes.

Le but des traitement est d'arriver à une réponse antivirale soutenue ou *sustained virological response* (SVR), caractérisée

par un ARN HCV indétectable (<10-15 UI/mL) 24 semaines après l'arrêt du traitement. La combinaison IFN- α /ribavirine permet une éradication du virus chez environ 80% des patients infectés par les génotypes 2 et 3. Cependant, seul 40 à 50% des patients infectés par le génotype 1 parviennent à une SVR (Pawlotsky, 2013). De plus, ces traitements sont souvent mal supportés et induisent de nombreux effets secondaires dont les plus graves peuvent amener à une diminution du traitement ou même à son arrêt chez 2 à 10% des patients (graves dépressions, chute du nombre de plaquettes et de globules blancs, maladies auto-immunes, atteintes rénales, cardiaques ou pulmonaires) (Dusheiko, 1997 ;

Quand la génétique gouverne la réponse aux traitements



En 2009, plusieurs études ont reporté que les variations génétiques en amont du gène *IL28B* codant l'IFN- λ -3, sont des prédictors de la réponse aux traitements anti-HCV (Ge *et al.*, 2009 ; Thomas *et al.*, 2009). Deux SNP (*single nucleotide polymorphism*) principaux ont été identifiés : un SNP favorable (rs8099917) et un SNP défavorable (rs12979860). Le polymorphisme favorable est associé à des taux plus élevés d'élimination virale en phase aiguë et à une meilleure réponse aux traitements en phase chronique. De plus, il est retrouvé plus fréquemment chez les patients d'origine européenne que chez les patients d'origine africaine, expliquant que les populations européennes répondent deux fois mieux aux traitements (Ge *et al.*, 2009). Le mécanisme par lequel le polymorphisme d'*IL28B* influence l'élimination du virus est encore inconnu. Il semblerait que les patients portant l'allèle défavorable aient des taux d'ISG beaucoup plus élevés lors de l'infection, expliquant ainsi une mauvaise réponse à l'IFN exogène administré lors du traitement (Hayes *et al.*, 2012). Cette découverte permettrait de personnaliser les traitements pour les patients ayant une génétique défavorable.

Pawlotsky, 2013). Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques s'avérait donc nécessaire pour lutter contre HCV.

Depuis plus de 20 ans, le développement de nouveaux modèles d'études des interactions virus-hôte (voir le chapitre « Modèle d'étude du HCV ») et la résolution 3D de plusieurs protéines virales ont permis l'identification de nombreuses cibles potentielles pour éradiquer HCV. Ces découvertes ont conduit au développement de petites molécules inhibitrices prometteuses, augmentant considérablement l'efficacité des traitements et présentant peu d'effets secondaires. Il s'agit des agents antiviraux à action directe ou *direct-acting antiviral agents* (DAA), qui comme leur nom l'indique ciblent directement le virus, et des agents antiviraux à action indirecte ou *host-targeting agents* (HTA), ciblant les facteurs de l'hôte indispensables à la réplication virale (Liang et Ghany, 2013).

a) Les DAA

Inhibiteur de la protéase virale NS3-NS4A

Récemment, les thérapies anti-HCV ont connu une vraie révolution grâce au « boom » des DAA. En 2011, les premiers inhibiteurs de la protéase virale NS3-NS4A, le Telaprevir (Vertex/Janssen) et le Boceprevir (Merck) ont été autorisés aux Etats-Unis et en Europe pour le traitement de l'infection chronique par le génotype 1, en association avec l'IFN- α et la ribavirine (Jacobson *et al.*, 2011 ; Poordad *et al.*, 2011). Les études cliniques de phase III ont démontré que les patients traités par une trithérapie avec le Telaprevir parviennent à une SVR en 24 semaines dans 89% des cas contre 54% des patients traités par l'IFN- α et la ribavirine seuls (Jacobson *et al.*, 2011). De même, la trithérapie avec le Boceprevir montre des taux de SVR de 63 à 66% contre 38% pour les patients traités en bithérapie (Poordad *et al.*, 2011). A ce jour, la trithérapie n'est utilisée que pour traiter l'infection par le génotype 1 (Pawlotsky, 2013).

Bien que ces 2 molécules augmentent considérablement l'efficacité des traitements anti-HCV, elles induisent des effets secondaires supplémentaires comme l'anémie dans 36 à 50% des cas. De plus, ce traitement n'est pas applicable aux patients ayant reçu une TH à cause des interactions médicamenteuses observées avec les immunosuppresseurs et des effets secondaires graves qui ont pu être rapportés. Enfin, ce traitement s'avère plus complexe à respecter pour les patients car ils sont contraints de prendre un plus grand nombre de comprimés dont certains toutes les 8h (Liang et Ghany, 2013).

Depuis, de nouveaux inhibiteurs de la protéase virale ont été développés et sont actuellement testés en phase clinique II ou III. C'est le cas par exemple du Simeprevir (Janssen), du Faldaprevir (Boehringer-Ingelheim) ou du Sovaprevir (Achillion) (Pawlotsky, 2014). Ces inhibiteurs de première génération possèdent néanmoins une faible barrière génétique à la résistance : l'utilisation de ces molécules engendre rapidement des variants HCV résistants aux traitements. De plus, les molécules faisant partie de la même classe d'inhibiteurs, et ciblant la même protéine virale, ne peuvent pas se substituer les uns aux autres. En effet, si des variants résistants émergent avec l'une, les autres molécules ne seront plus efficaces (Liang et Ghany, 2013). A l'heure actuelle, une seconde génération d'inhibiteur de NS3-NS4A, comme le MK-5172 (Merck) ou l'ACH-2684 (Achillion), sont testés en essais cliniques. Ils possèdent une barrière génétique à la résistance beaucoup plus élevée que les molécules de première génération et possèdent une activité pangénotypique (Pawlotsky, 2014).

Inhibiteur de la polymérase virale NS5B

Il existe 2 classes d'inhibiteurs de la polymérase virale : des analogues nucléos(t)idiques et non-nucléosidiques (Eltahla *et al.*, 2015). Les analogues nucléos(t)idiques ciblent le site actif de l'ARN polymérase ARN dépendante virale, NS5B. Ces analogues sont incorporés dans la séquence ARN des génomes viraux naissants et stoppent l'incorporation d'autres nucléotides. Pour éviter une dissémination systémique de ces analogues, ils sont développés sous forme de « prodrogues » qui seront clivées préférentiellement par des enzymes hépatiques. Le site actif de la polymérase est très conservé au sein des différents génotypes du HCV. Bien qu'une seule mutation suffise pour conférer une résistance à ces molécules, ce genre de phénomène est peu courant. De plus, les variants possédant ces mutations ont des taux de répllication très bas et deviennent cliniquement insignifiants. Par conséquent, les analogues nucléos(t)idiques possèdent une barrière génétique à la résistance très élevée. La Valopicitabine a été la première molécule prouvant l'efficacité de ces analogues. Son développement fut néanmoins stoppé à cause d'effets secondaires important au niveau gastro-intestinal (Eltahla *et al.*, 2015).

En 2013, le premier composé à avoir été approuvé pour le traitement de l'hépatite C chronique a été le Sofosbuvir (Gilead), correspondant au 2'-F-2'-C-méthyluridine monophosphate (Sofia *et al.*, 2010 ; Gane *et al.*, 2013 ; Jacobson *et al.*, 2013 ; Lawitz *et al.*, 2013). En association avec l'IFN- α et la ribavirine, le Sofosbuvir permet des taux de SVR atteignant jusqu'à 90% en 12 semaines, y compris pour des infections chroniques par le

génotype 1 (Lawitz *et al.*, 2013). D'autres études ont démontré que le Sofosbuvir en association avec la ribavirine seule pouvait également induire de fort taux de SVR chez les patients infectés par les génotypes 2 et 3 (Gane *et al.*, 2013 ; Jacobson *et al.*, 2013). Depuis, la combinaison du Sofosbuvir avec la ribavirine ou d'autres DAA a permis de développer des traitements sans IFN, offrant un confort de vie amélioré aux patients. En 2015, les combinaisons Sofosbuvir/Simeprevir (inhibiteur de la protéase virale NS3/NS4A) et Sofosbuvir/Ledipasvir (inhibiteur de NS5A) ont notamment été approuvées pour le traitement des infections chroniques par HCV (Asselah *et al.*, 2015).

Les analogues non nucléosidiques représentent quant-à-eux une famille de drogues très hétérogènes ciblant un des cinq sites allostériques de la polymérase virale. La polymérase virale du HCV est comparée à une main droite, avec des domaines correspondant au pouce, à la paume et aux doigts. Les analogues non nucléosidiques peuvent se fixer dans les 2 domaines du « pouce » et dans les 2 domaines de la paume. Ils agissent de manière non-compétitive en inhibant les changements conformationnels nécessaires à l'activité polymérase. A l'heure actuelle, plusieurs molécules de deuxième génération sont en phase de développement préclinique (pour revue, voir Pawlotsky, 2014 ; Eltahla *et al.*, 2015).

Inhibiteur de la protéine NS5A

NS5A est une protéine virale multifonctionnelle régulant à la fois la réplication virale et la production de virions. Les inhibiteurs de NS5A développés à ce jour se lient au domaine I de la protéine, domaine lui permettant de se lier à l'ARN viral, et bloquent par conséquent sa capacité à réguler la réplication du virus. Ces inhibiteurs sont également capables de bloquer l'assemblage et l'export des virus nouvellement produits par un mécanisme encore inconnu. Ce double effet inhibiteur permet une diminution rapide et efficace de la production de virus dès les premiers jours de traitement. La première génération de molécules développées inclut le Daclatasvir (Bristol-Myers Squibb) et le Ledipasvir (Gilead). Ils sont très actifs contre les génotypes 1 et 4 mais présentent une efficacité moindre contre les génotypes 2 et 3. De plus, ils présentent une barrière génétique à la résistance basse. Actuellement, une seconde génération a été développée, avec barrière génétique à la résistance améliorée (Pawlotsky, 2014).

b) Les HTA

Afin de s'affranchir des problèmes de résistance virale, d'autres molécules ont été développées pour lutter contre les infections par HCV. Il s'agit des HTA qui comme leur

nom l'indique ciblent les facteurs de l'hôte indispensable au cycle viral du HCV. En ciblant les protéines de l'hôte, les HTA ont une activité pangénotypique et une barrière génétique à la résistance très élevée. A l'heure actuelle, plusieurs HTA sont entrés en phase clinique II ou III. Ils peuvent être utilisés seuls, en combinaison avec d'autres HTA ou avec des DAA. Les molécules les plus prometteuses sont les inhibiteurs de cyclophilines, comme l'alisporivir (Debiopharm), qui inhibent la réplication du virus, et les antagonistes du microARN 122 (miR122), comme le Miravirsén (Santaris Pharma). Ce dernier se lie au miR122, un microARN très exprimé dans le foie indispensable à la traduction et la réplication du HCV, et inhibe ainsi la multiplication du virus. Ces traitements sont détaillés dans la revue intitulée « Host-Targeting Agents to Prevent and Cure Hepatitis C Virus Infection » est présentée en annexe (Zeisel, **Crouch** *et al.*, *Viruses*, 2015).

c) Thérapies anti-HCV : le début de la fin ?

Depuis l'essor des DAA, les nouvelles thérapies d'avenir évolueront vers des traitements sans IFN et seront basées sur des combinaisons de DAA et de HTA, dont plusieurs sont déjà autorisées (Pawlotsky, 2014 ; Asselah *et al.*, 2015). Ces combinaisons ont d'ores et déjà fait leurs preuves en phase clinique et sont mieux tolérées par les patients. Cependant, certaines questions demeurent. Tout d'abord, bien que les traitements soient très efficaces, de nombreuses résistances virales ont émergé. Le taux de multiplication élevé du HCV ainsi que l'infidélité de l'ARN polymérase virale entraînent des variabilités génétiques non négligeables conduisant à une sélection rapide de variants résistants aux drogues (Esposito *et al.*, 2016). Ce point reste problématique notamment pour les patients ne répondant pas au traitement et devant bénéficier d'une autre stratégie thérapeutique ou dans le cas des rechutes (Pawlosty, 2014).


Les nouveaux DAA ont montré une efficacité remarquable y compris pour les populations difficiles à traiter ne pouvant pas recevoir de traitement à base d'IFN- α (Ferenci *et al.*, 2015). Cependant le choix de la stratégie thérapeutique demeure un vrai challenge pour certaines populations. Par exemple, chez les patients co-infectés par HIV, des interactions médicamenteuses peuvent survenir entre les antirétroviraux et les DAA. Le choix thérapeutique s'avère également crucial pour les femmes enceintes, les enfants, les patients présentant une décompensation hépatique sévère ou encore les patients présentant des insuffisances rénales (Pawlotsky, 2014). Le choix thérapeutique dépend en

général du génotype viral, du profil du patient, du taux de SVR espéré, de la durée souhaitée du traitement, des effets secondaires à éviter... Ceci nous permet d'imaginer qu'à terme, un traitement individualisé et personnalisé pourra être proposé au patient sous forme de thérapie idéale : courte, efficace et bien tolérée (Pawlotsky, 2014 ; Liang et Ghany, 2016). Toutefois, il ne faut pas oublier qu'en parallèle de ces progrès thérapeutiques impressionnants, les méthodes de diagnostics des hépatites aiguës doivent continuer à être améliorées et la recherche pour le développement d'un vaccin préventif doit perdurer.

En réalité, le plus gros challenge à relever ne concerne pas l'efficacité des nouveaux traitements mais la maîtrise de leur coût élevé, la mise en place d'une politique de prise en charge dans les pays industrialisés et leur accessibilité dans les pays en voie de développement (Chung et Baumert, 2014). En d'autres termes : « *Ce n'est pas la fin. Ce n'est même pas le commencement de la fin. Mais, c'est peut-être la fin du commencement* » (Winston Churchill / Discours - 10 Novembre 1942).

3. La transplantation hépatique

Comme décrit précédemment, l'infection chronique par HCV est un facteur majeur menant à la cirrhose hépatique et au CHC. A un stade très avancé, la cirrhose comme le CHC peuvent mener à une insuffisance hépatique grave (ou décompensation hépatique) nécessitant une TH (**voir encadré**). Chaque année, les infections par HCV sont responsables de près de 50% des TH en Europe et en Amérique du Nord (Gane, 2008 ; Felmlee *et al.*, 2016).



La TH en quelques chiffres

- La première tentative de TH a été réalisée à Denver, aux Etats-Unis, en 1963 par l'équipe de Thomas Starzl. En 1967, la même équipe réalise plusieurs TH avec succès grâce aux progrès de l'immunosuppression et les premières solutions de préservation du greffon.
- En France, les premières TH remontent à 1964 (Demirleau) et à 1966 (Garnier et Cordier).
- Après le rein, le foie est l'organe le plus transplanté en France.
- En 2015, l'Agence de Biomédecine a relevé 1355 TH en France.

Après une TH, l'organe transplanté est systématiquement réinfecté par le virus, quelques heures seulement après l'opération (Garcia-Retortillo *et al.*, 2002). La réinfection est associée à une accélération de la maladie : 20 à 30% des patients développent une cirrhose hépatique seulement 5 ans après la transplantation, évoluant rapidement vers une décompensation hépatique (Gane, 2008). De plus, certains traitements immunosuppresseurs aggravent la réinfection du greffon par le HCV et sont associés à une augmentation de la mortalité des patients transplantés (Hsu *et al.*, 2013). Chez ces patients,

la « re-transplantation hépatique » (RTH) est une des seules options thérapeutiques. Au vu du manque d'organes, de la dégradation rapide des greffons après réinfection, et de l'espérance de vie diminuée après une deuxième TH, la RTH pose des problèmes éthiques majeurs (Vinaixa *et al.*, 2013). Le développement de nouvelles options thérapeutiques pour les patients subissant une TH demeure donc nécessaire.

La stratégie optimale consisterait à éliminer le virus avant la TH. Jusqu'alors cette stratégie se révélait difficile à cause de l'efficacité limitée des traitements standards, notamment pour les patients présentant une cirrhose très avancée (Felmlee *et al.*, 2016). Depuis l'arrivée des DAA, une récente étude clinique a démontré l'efficacité de l'association Sofosbuvir/ribavirine pour prévenir de la réinfection par HCV. Dans cette étude, 70% des patients ont montré une réponse virologique en 12 semaines après la TH (Curry *et al.*, 2015). Cependant, l'efficacité de cette stratégie est très génotype-dépendante et nécessite encore plusieurs études et essais cliniques.

Le traitement des patients après la TH par les DAA s'avère difficile. Historiquement, deux stratégies étaient envisageables : traiter dès le premier mois après la TH, ou attendre que l'hépatite C chronique soit observée. En dépit du bénéfice évident d'un traitement précoce, cette stratégie n'était pas utilisée à cause des effets secondaires engendrés par les traitements à l'IFN- α durant la période post-opératoire. A l'ère des DAA, des traitements sans IFN pourraient être envisagés rapidement après la TH (Felmlee *et al.*, 2016). Néanmoins, les interactions médicamenteuses entre les immunosuppresseurs et les DAA doivent être pris en compte lors de l'élaboration des nouveaux traitements. Certains DAA comme le Simeprevir, ne peuvent être utilisés en association avec les immunosuppresseurs de la classe des inhibiteurs de calcineurine. L'utilisation de la combinaison Sofosbuvir/Daclatasvir nécessite également une modification des doses des traitements immunosuppresseurs (Felmlee *et al.*, 2015).

Enfin, la dernière stratégie envisagée serait d'inhiber la réinfection en utilisant de manière concomitante à la TH des inhibiteurs d'entrée du HCV, comme des anticorps dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe du HCV. En 2013, une étude menée par Chung et ses collaborateurs a évalué les effets d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine virale E2 chez des patients transplantés. Malgré une nette diminution, un rebond de la charge virale a été observée chez tous les patients (Chung *et al.*, 2013). Ce phénomène s'explique par l'apparition de variants viraux sélectionnés après la TH caractérisés par une entrée dans les hépatocytes plus efficace et par une capacité augmentée d'échappement aux anticorps neutralisants (Fafi-Kremer *et al.*, 2010). Une

solution serait donc d'utiliser des HTA pour bloquer l'étape d'entrée du HCV lors d'un TH et prévenir la réinfection des greffons. Plusieurs molécules ciblant les facteurs d'entrée du HCV ont d'ores et déjà montré leur efficacité à inhiber l'entrée virale *in vitro* et *in vivo* comme le ITX-5061, un anticorps monoclonal ciblant le *scavenger receptor class B type 1* (SR-BI) (Sulkowski *et al.*, 2014), ou les anticorps monoclonaux anti-claudine 1 (CLDN1) développés dans notre laboratoire (Mailly *et al.*, 2015).

V. Le métabolisme des lipoprotéines

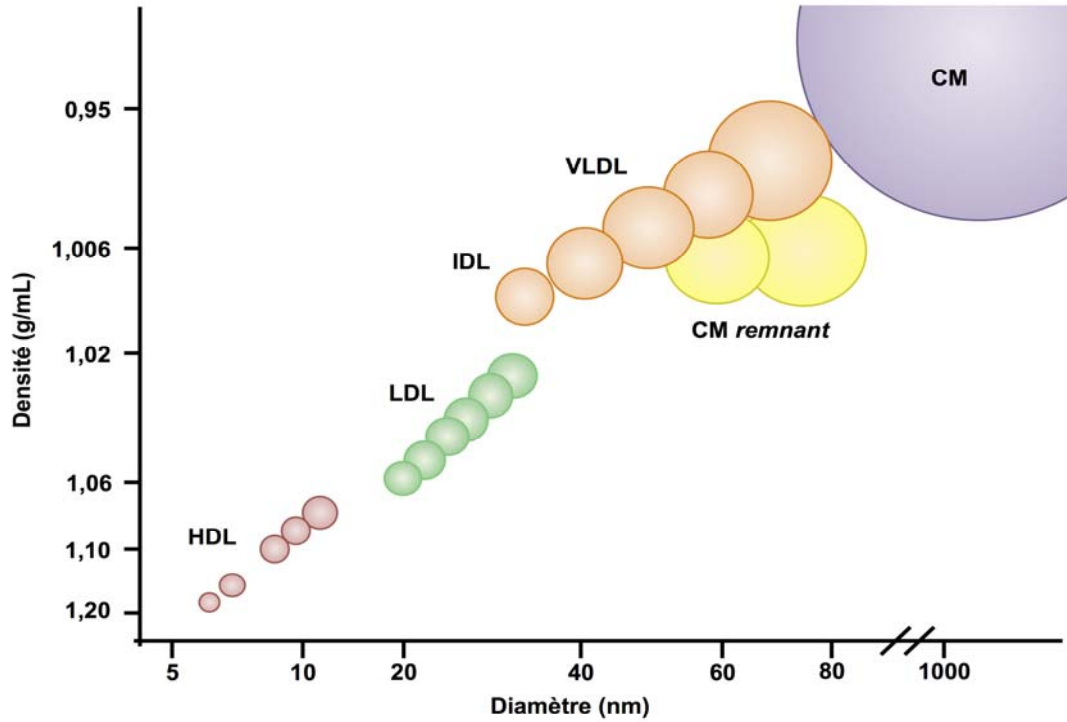
Une caractéristique majeure du HCV est son intime connexion avec le métabolisme des lipides et des lipoprotéines. Afin de mieux comprendre le cycle de réplication viral et les relations du virus avec sa cellule hôte, cette partie résume les caractéristiques des lipoprotéines, leur composition et leur rôle dans l'organisme. De plus, ce chapitre présente une protéine particulière, l'apolipoprotéine E (apoE), qui est à la fois régulatrice du métabolisme des lipides et un facteur de l'hôte indispensable à la dissémination du HCV.

1. Classification et structure des lipoprotéines

Les propriétés physiques des lipides les rendent insolubles en milieu aqueux ; ils sont donc véhiculés à travers l'organisme grâce à des édifices macromoléculaires complexes nommés lipoprotéines. Les lipoprotéines constituent une vaste famille de particules classées en 5 grandes catégories chez l'Homme, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (Lagrost *et al.*, 2005, d'après site web NSFA⁴).

Les lipoprotéines diffèrent par leur composition en lipides et en protéines, ce qui détermine leur densité ; les lipoprotéines les moins denses étant les plus riches en lipides et les plus denses étant les plus riches en protéines. Ainsi, des moins denses au plus denses, nous retrouvons: les chylomicrons (CM), les *very low density lipoprotein* (VLDL), les *intermediate density lipoprotein* (IDL), les *low density lipoprotein* (LDL), et les *high density lipoprotein* (HDL) (Hegele, 2009). Leurs propriétés respectives sont illustrées ci-dessous dans la **figure 10**.

⁴ <http://www.nsf.asso.fr/chercheurs/ressources-medicales/atherosclerose-physiopathologie/lipoproteines-et-metabolisme#nb5>



Classe	Voie reverse	Voie endogène			Voie exogène
	HDL	LDL	IDL	VLDL	CM
Densité (g/mL)	1,063-1,210	1,019-1,063	1,006-1,019	0,950-1,006	< 0,95
Diamètre (nm)	5-15	18-28	25-50	30-80	100-1000
Protéines (%)	33-57	20-25	18-20	7-10	< 2
Cholestérol (%)	17-40	45-58	29-45	20-25	4-8
Triglycérides (%)	3-15	10-15	25-31	50-55	84-88
Principales apo	AI, AII, C, E	B-100	B-100, E, C	B-100, E, C	B-48, E, C
Mobilité électrophorétique	α	β	pré-β	pré-β	Pas de migration

Figure 10. Propriétés physicochimiques des lipoprotéines sanguines. Le graphique ci-dessus représente la densité des lipoprotéines (g/mL) en fonction de leur taille (diamètre en nm). La densité est inversement proportionnelle à la taille. Les 5 classes principales de lipoprotéines y sont schématiquement représentées, ainsi que leurs sous-types. Le tableau répertorie leurs principales propriétés. Les CM et les VLDL sont les lipoprotéines les moins denses, et les plus riches en triglycérides. Les LDL et les HDL sont quant-à-elle les plus denses et les plus riches en cholestérol et représentent la majorité des lipoprotéines sanguines. Les IDL, comme leur nom l'indique, constituent une classe de lipoprotéines intermédiaire entre les VLDL et les LDL. Chaque classe de lipoprotéines est impliquée dans un type différent de transport des lipides. Les HDL participent à la voie de transport inverse du cholestérol des organes périphériques vers le foie. Les VLDL, IDL, et LDL participent à la voie endogène de transport des triglycérides et du cholestérol du foie vers les organes périphériques. Les CM sont impliqués dans la voie de transport exogène des triglycérides (provenant de l'alimentation) des intestins au foie. Graphique adapté de Feingold et Grunfeld, 2015. Données extraites de Lagrost *et al.*, 2005 et Aizawa *et al.*, 2015.

En dépit de leurs différences, les lipoprotéines possèdent toutes une structure commune. Ce sont des complexes macromoléculaires formés d'une monocouche de phospholipides

(PL) dans laquelle est intégré du cholestérol libre (CL). Ces molécules exposent leur partie polaire vers la surface de la particule et leur partie apolaire vers le cœur du complexe. Celui-ci est fortement apolaire et contient des triglycérides (TG) et du cholestérol estérifié (CE). Ces structures sont stabilisées par des protéines particulières aux propriétés amphiphiles, les apolipoprotéines (apo) (**Figure 11**) (Hegele, 2009). En plus de leur rôle structural, les apo servent de ligands pour les récepteurs cellulaires des lipoprotéines mais aussi de co-facteurs pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines (Aizawa *et al.*, 2015).

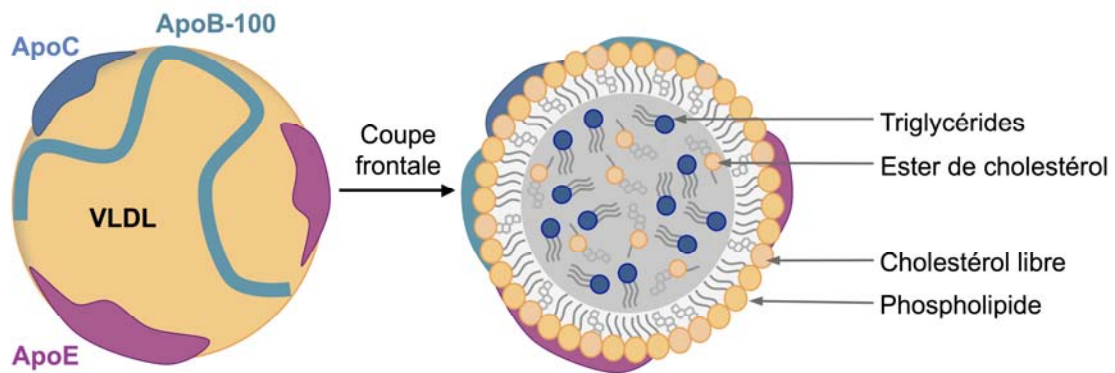


Figure 11. Structure des lipoprotéines, exemple des VLDL. Les lipoprotéines possèdent toutes la même structure de base. Elles possèdent un cœur apolaire formé de triglycérides et d'esters de cholestérol entouré d'une enveloppe amphiphile constituée d'une monocouche de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines enchâssées dans le complexe lipidique. Le schéma ci-dessus représente une VLDL riche en triglycérides. Les apolipoprotéines associées aux VLDL sont l'apoB-100 (une seule molécule d'apoB-100 englobant la totalité de la particule), apoE et apoC (plusieurs protéines échangeables).

Les deux lipides majoritairement transportés par les lipoprotéines sont les TG et le cholestérol. Les TG sont formés de 3 acides gras (AG) liés à une molécule de glycérol. Ils constituent une importante réserve d'énergie. En fonction des besoins de l'organisme ils permettent d'apporter des AG à une grande variété de cellules. Ils y seront dégradés par la β -oxydation afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP. Les TG sont majoritairement transportés par les CM, les VLDL et les IDL. Ces lipoprotéines ainsi que les résidus issus de leur dégradation ou *remnants*, présents dans la circulation sanguine, appartiennent à la famille des *triglyceride rich lipoproteins* ou TRL. Alors que les CM transportent les TG issus de l'alimentation, les VLDL et les IDL distribuent les TG endogènes synthétisés par le foie. Le cholestérol quant-à-lui possède de nombreux rôles ; il est à la fois, un composant des membranes cellulaires, un précurseur des hormones stéroïdiennes, de la vitamine D, des acides biliaires et d'autres oxystérols et un composé indispensable à la

neurotransmission. Les LDL et HDL sont spécialisées dans le transport du cholestérol dans l'organisme. Les LDL, transportent le cholestérol du foie vers les organes alors que les HDL assurent la voie de transport inverse du cholestérol des tissus vers le foie (Aizawa *et al.*, 2015).

2. Les différentes voies de transport des lipides

a) La voie exogène ou voie entéro-hépatique

Les TG et le cholestérol d'origine alimentaire sont absorbés par les cellules intestinales lors de la digestion et sont pris en charge par les CM pour être distribués dans l'organisme. Ce processus est résumé dans la **figure 12**. Les TG représentent environ 90% des lipides apportés par l'alimentation (Aizawa *et al.*, 2015). Dans l'intestin grêle, ils sont hydrolysés par la lipase pancréatique et émulsifiés par la bile en micelles. Les AG libres ainsi générés sont captés par les cellules intestinales grâce à la *fatty acid binding protein* (FABP). Ils seront à nouveau transformés en TG dans la cellule grâce à plusieurs enzymes clés dont DGAT-1 et -2 (Brahm et Hegele, 2015). Le cholestérol alimentaire ne représente que 25% du cholestérol pris en charge par les CM. En effet, la majorité du cholestérol absorbé au niveau des intestins provient de la réabsorption d'une partie des acides biliaires (50% des acides biliaires produits). Le cholestérol est lui aussi intégré dans des structures micellaires facilitant son absorption par les cellules intestinales *via* le *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1) (Gylling, 2004 ; Morgan *et al.*, 2016).

Après absorption des lipides, la synthèse des CM est initiée par la production d'apoB dans les entérocytes. Dans ces cellules, l'apoB produite est l'apoB-48 (48kDa). ApoB-48 est une forme tronquée de l'apoB-100 (100kDa) issue de l'édition de l'ARNm d'apoB (Davidson et Shelness, 2000). Elle est produite vers la lumière du réticulum endoplasmique (RE) et lipidée cotraductionnellement par la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP). La protéine lipidée fusionne ensuite avec les gouttelettes lipidiques (GL) (Ramasamy, 2014). Ces dernières sont des organites spécialisés dans le stockage des lipides neutres, en majorité des TG et du CE (Roingeard et Depla, 2011) ; La particule ensuite est maturée par l'ajout de plusieurs apo comme **l'apoA-IV (voir encadré)** (Davidson et Shelness, 2000 ; Xiao *et al.*, 2011). Les CM matures sont secrétés dans la circulation lymphatique et rejoignent la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière gauche. Une fois dans le sang, les CM acquièrent apoE et apoC (apoC-II et apoC-III) à leur surface, ces apo provenant majoritairement du métabolisme des HDL

(Xiao *et al.*, 2011 ; Ramasamy, 2014). Dans les capillaires sanguins, la *lipoprotein lipase* (LPL), présente à la surface des cellules endothéliales, est activée par l'apoC-II présente sur les CM et va hydrolyser les TG pour libérer des AG. La LPL est particulièrement exprimée au niveau du tissu adipeux et des muscles. Les AG seront soit stockés dans les adipocytes, soit β oxydés dans les muscles pour apporter de l'énergie.

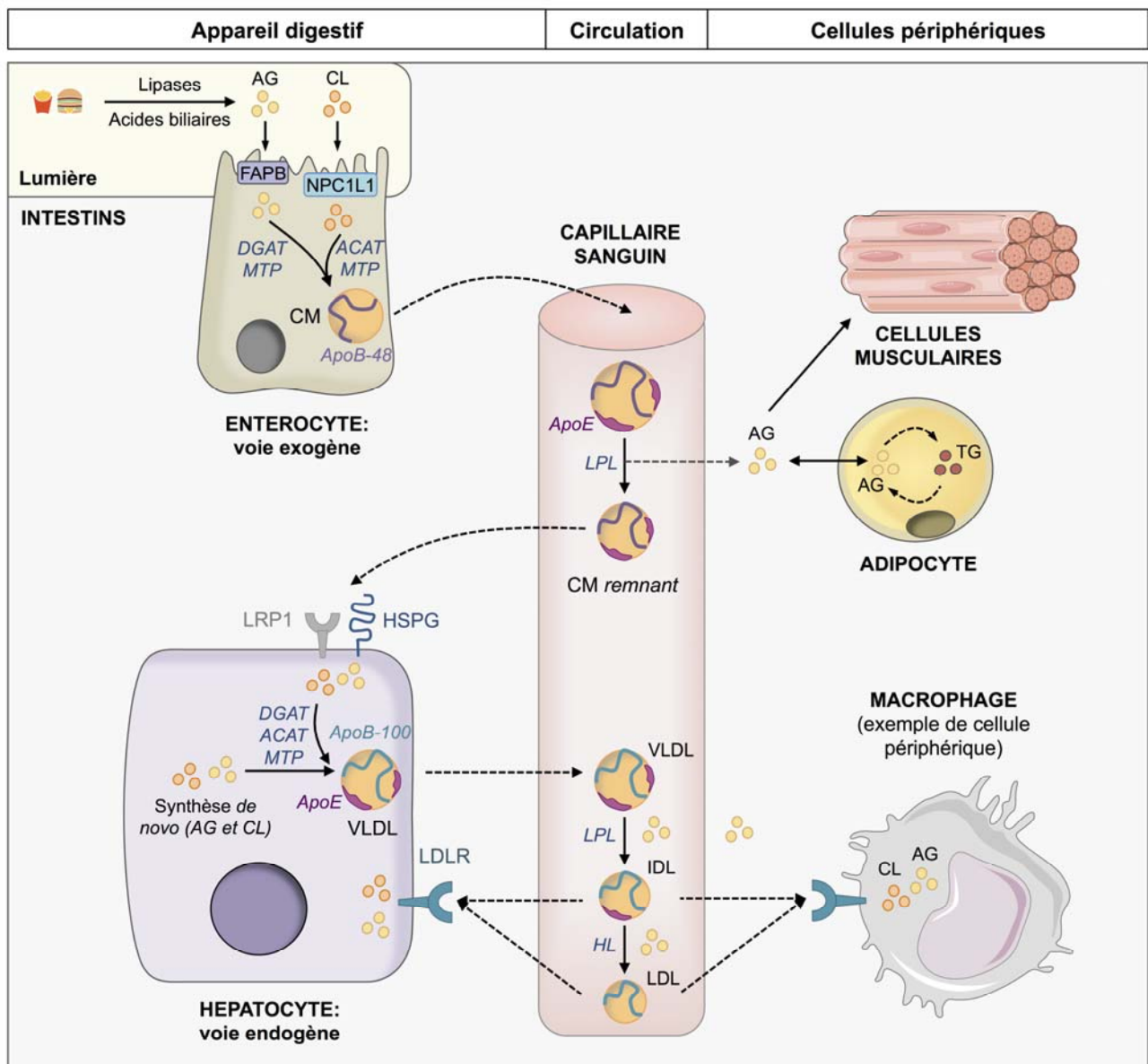


ApoA-IV : le « fat gatekeeper »

Lors d'un apport conséquent en lipides par l'alimentation, les cellules intestinales répondent en augmentant leur production d'apoA-IV qui est incorporée aux CM. La production d'apoA-IV est très rapide (de 15 à 30 min après le repas) et sa sécrétion dans la circulation induit un effet de satiété, diminuant la prise alimentaire par des mécanismes encore peu compris. Elle est également produite par l'hypothalamus, où elle agit de manière synergique avec la leptine, l'hormone de satiété par excellence. La consommation chronique d'une alimentation riche en lipides réduit considérablement la production d'apoA-IV et la réponse hypothalamique, contribuant ainsi au développement de l'obésité (Kohan *et al.*, 2015).

Lors de la lyse des TG, la taille des CM diminue et apoC-II est à nouveau transférée aux HDL. La perte d'apoC-II, l'activateur de la LPL, permet d'éviter une dégradation trop importante des CM. De ce processus résulte la production de résidus de CM nommés *remnants*. Au niveau du foie, les *remnants* passent dans l'espace de Disse où ils sont enrichis en apoE libre sécrétée par les hépatocytes, facilitant ainsi leur capture par des récepteurs hépatiques liant apoE : les *heparan sulfate proteoglycan* (HSPG), le LDLR et le *LDLR related protein 1* (LRP1) (Hegele, 2009 ; Xiao *et al.*, 2011). Le LDLR possède deux ligands principaux qui sont apoB-100 et apoE. Les *remnants* de CM portent une forme tronquée d'apoB, l'apoB-48, qui ne possède pas le site de liaison au LDLR ; leur capture dépend donc principalement d'apoE. (Davidson et Shelness, 2000). Après leur capture par le foie, les lipides contenus dans les *remnants* de CM ont plusieurs devenir : ils peuvent être dégradés, stockés dans les GL ou remis en circulation par la voie endogène de transport des lipides.

NB : Les hépatocytes sont des cellules polarisées possédant un pôle basal (reposant sur une lame basale) et un pôle apical où sont présentes des microvillosités. Ces pôles ne sont pas illustrés dans les schémas présentés pour plus de simplicité.



PETIT LEXIQUE	
Lipoprotéines	
CM:	chylomicrons
IDL:	intermediate density lipoprotein
LDL:	low density lipoprotein
VLDL:	very low density lipoprotein
Lipides	
AG:	acide gras
CE:	cholestérol estérifié
CL:	cholestérol libre
TG:	triglycérides
Enzymes	
ACAT:	acyl-CoA cholesterol acyltransferase
DGAT:	diglyceride acyltransferase
HL:	hepatic lipase
MTP:	microsomal triglyceride transfer protein
LPL:	lipoprotein lipase
Récepteurs / Transporteurs	
FABP:	fatty acid binding protein
HSPG:	heparan sulfate proteoglycan
LDLR:	low density lipoprotein receptor
LRP1:	LDLR related protein 1
NPC1L1:	Niemann-Pick C1-like 1

Figure 12. Métabolisme des TRL : voie exogène et endogène de transport des lipides. Durant la digestion, les AG et le CL issus de l'alimentation sont émulsifiés par les acides biliaires et captés par les entérocytes par la FABP et le NPC1L1, respectivement. Les AG sont transformés en TG grâce à plusieurs enzymes dont DGAT-1 et -2. Le CL peut être estérifié par l'ACAT. Les lipides sont ensuite combinés à l'apoB-48 par la MTP pour produire les CM. Les CM sont sécrétés dans la circulation où ils acquièrent apoE. La LPL va hydrolyser les TG pour libérer des AG utilisés par les cellules périphériques. La LPL est fortement exprimée dans les capillaires du tissu adipeux où les AG sont stockés dans les adipocytes sous forme de TG, mais également dans les muscles squelettiques où ils sont dégradés pour produire de l'énergie. Les résidus de CM, ou *remnants*, générés par l'action de la LPL sont captés par les hépatocytes majoritairement *via* le LRP1 et les HSPG. Le CL et les TG aussi bien issus de l'alimentation que produits *de novo*, peuvent être remis en circulation par le foie sous forme de VLDL. Les VLDL sont produites à partir de la lipodation de

l'apoB-100. Le processus de synthèse des VLDL est sensiblement le même que celui des CM. Une fois dans la circulation sanguine, les VLDL sont dégradées par la LPL pour libérer des AG. Les *remnants* de VLDL, ou IDL, sont à leur tour transformés en LDL par la LH. Les IDL et LDL peuvent être éliminées par le foie *via* le LDLR ou par certaines cellules périphériques possédant ce récepteur comme les macrophages.

b) La voie endogène de transport des lipides : rôle des VLDL, IDL, LDL

Le foie, acteur majeur de l'homéostasie des lipides, centralise le métabolisme des lipoprotéines. Comme décrit précédemment, le foie prend en charge les lipides alimentaires en excès provenant des *remnants* de CM mais peut également produire des TG et du cholestérol de *novo* (Gylling, 2004 ; Ramasamy, 2014). En fonction des besoins de l'organisme, ces lipides sont remis en circulation grâce aux VLDL. Le processus de production des VLDL est sensiblement le même que celui des CM. La différence majeure réside dans la production d'apoB: alors que les intestins produisent une forme tronquée de la protéine (apoB-48), le foie synthétise l'apoB-100 dans son intégralité. Une seule molécule d'apoB-100 est retrouvée à la surface de chaque VLDL (Davidson et Shelness, 2000). De plus, contrairement aux entérocytes, les hépatocytes produisent apoE qui est intégrée aux VLDL directement dans la cellule (Ramasamy, 2014). Tout comme les CM, les VLDL sont progressivement dégradées dans la circulation sanguine par la LPL endothéliale pour libérer des AG (**Figure 12**). L'action de la LPL couplée à la perte d'une partie d'apoC-II et d'apoE transforme les VLDL en particules plus petites nommées IDL (aussi appelées VLDL *remnants*). Environ la moitié des IDL est internalisée par le foie *via* l'interaction d'apoB-100 et d'apoE avec le LDLR ou par l'action combinée des HSPG et du LRP1. L'autre moitié sera transformée en LDL par la lipase hépatique (LH) (**Figure 12**). Cette enzyme hydrolyse les TG résiduels des IDL, entraînant une réduction de la taille des particules et une relocalisation des apo échangeables (apoC, apoE) sur d'autres lipoprotéines. Il en résulte la production de particules principalement composées de cholestérol et d'apoB-100, les LDL (Feingold et Grunfeld, 2015 ; Morgan *et al.*, 2016). Les LDL permettent donc d'acheminer le cholestérol vers les cellules périphériques qui expriment le LDLR à leur surface comme les macrophages, les adipocytes et les cellules musculaires. Les LDL en excès retournent au foie (Feingold et Grunfeld, 2015).

En résumé, la voie de transport endogène permet le transport des TG et du cholestérol du foie, vers les organes périphériques. Bien qu'absolument nécessaire au métabolisme énergétique, les LDL sont associées au « **mauvais cholestérol** » (**voir encadré**) dans le

langage courant en raison de la corrélation entre les taux de LDL sanguines et le développement de troubles métaboliques (obésité, diabète) et de maladies cardiovasculaires (athérosclérose) (Feingold et Grunfeld, 2015).

c) La voie de transport inverse du cholestérol

A l'inverse, il existe une voie permettant le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Il s'agit de la voie de transport inverse du cholestérol impliquant les HDL. Les HDL sont une famille de lipoprotéines très hétérogènes, de taille et de composition variée (pour revue, voir Kontush *et al.*, 2015). L'apo principalement retrouvée à la surface des HDL est l'apoA-I. ApoA-I est majoritairement produite par les hépatocytes et les entérocytes sous forme libre ou peu lipidée. Après sa sécrétion, elle recrute du CL et des phospholipides pour produire des HDL naissantes discoïdes, en interagissant avec l'*ATP binding cassette subfamily A member 1 human* (ABCA1) (Fitzgerald *et al.*, 2010, Zannis *et al.*, 2015) (**Figure 13**). Bien que principalement lipidée par les hépatocytes, apoAI peut aussi lier ABCA1 à la surface d'autres types cellulaires comme les macrophages (Feingold et Grunfeld, 2015). Les HDL naissantes sont ensuite enrichies en CL au niveau des tissus périphériques, ou du foie lui-même, par l'action de l'*ATP binding cassette subfamily G member 1 human* (ABCG1), pour produire des HDL2 immatures. Contrairement à ABCA1 qui induit un efflux de CL sur l'apoA-I libre ou faiblement lipidée, ABCG1 induit un efflux de CL sur les HDL déjà formées (Fitzgerald *et al.*, 2010). Afin de produire de large HDL matures ou HDL3, le CL contenu à la surface des HDL doit être estérifié (CE) par une enzyme nommée *lecithin cholesterol acyltransferase* (LCAT) (**Figure 13**). Cette enzyme est activée par apoA-I (Zannis *et al.*, 2015).

Les HDL matures, chargées en CE, retournent ensuite au foie. Très souvent, la particule n'est pas internalisée et le CE est directement transféré dans les hépatocytes *via* l'interaction des HDL avec le SR-BI. Il en résulte la production de petites particules HDL qui retournent dans la circulation. ApoE est impliquée dans ce transfert en facilitant la présentation des HDL au SR-BI (Arai *et al.*, 1999 ; Bultel-Brienne *et al.*, 2002). Il existe également un mécanisme indirect permettant la capture du CE par le foie. En effet, le CE peut être transféré sur les LDL et VLDL par l'action de la *cholesteryl ester transfer protein* (CETP), puis être internalisé grâce au LDLR et au SR-BI (**Figure 13**). Le cholestérol retournant au foie peut être excrété dans les canaux biliaires par les *ATP binding cassette* ABCG5 et ABCG8 (Rader et Daugherty, 2008 ; Feingold et Grunfeld, 2015).

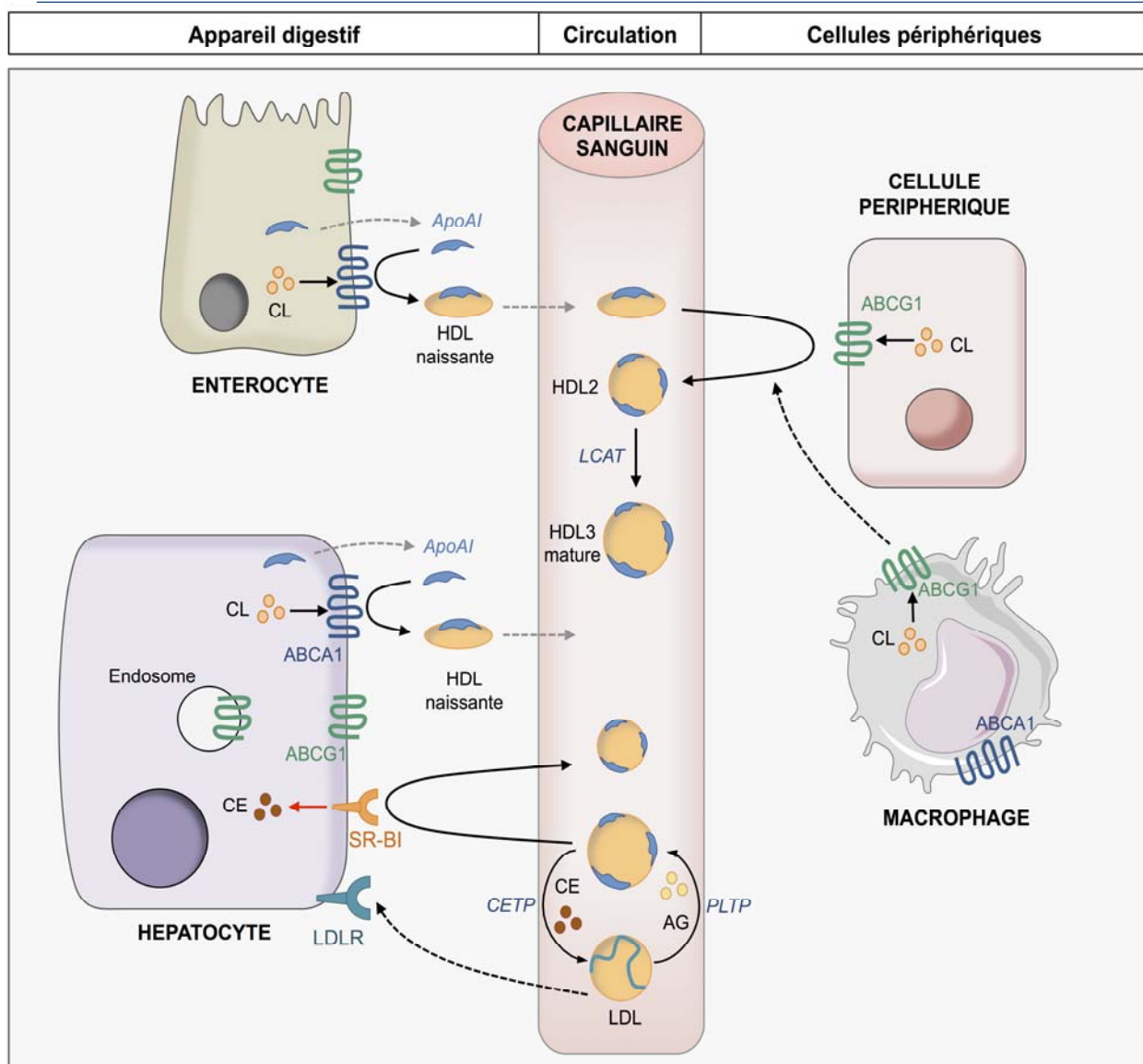
Il est à noter que de nombreux échanges ont lieu entre les différentes classes de lipoprotéines. Comme décrit précédemment, les apo échangeables peuvent passer d'une classe de lipoprotéine à l'autre dans la circulation. Il en va de même pour le CE grâce à la CETP. La *phospholipid transfer protein* (PLTP) constitue un autre exemple d'enzyme impliquée dans les échanges entre lipoprotéines puisqu'elle facilite le transfert des AG des VLDL et IDL aux HDL (Tzotzas *et al.*, 2009 ; Zannis *et al.*, 2015).

En résumé, la voie de transport inverse du cholestérol permet d'éliminer le cholestérol en excès accumulé dans les tissus périphériques. Les HDL ont donc des propriétés antiathérogènes et sont considérées dans le langage courant comme le « **bon cholestérol** » (voir encadré).



Bon et mauvais cholestérol : 50 nuances de gras.

Pendant très longtemps, les LDL ont été considérées comme le « mauvais cholestérol », contrairement aux HDL considérées comme le « bon cholestérol ». Le métabolisme des lipoprotéines est en réalité tout en nuances et bien plus complexe. Le dogme des HDL et du « bon cholestérol » est désormais révolu. Un article, très intéressant, de vulgarisation scientifique publié par Marc Gozlan dans Sciences et Avenir en 2013 nous explique la chute du dogme. Tout commença par une étude clinique réalisée par le laboratoire Roche sur une nouvelle molécule, le dalcetrapib, qui avait la propriété d'augmenter la quantité des HDL sanguines. Verdict de l'étude : le dalcetrapib ne protège pas des accidents cardiovasculaires (Schwartz *et al.*, 2012). Le coup de grâce est venu d'une équipe américaine démontrant que les personnes ayant de forts taux de HDL étaient tout aussi sujettes aux infarctus du myocarde que les personnes ayant de forts taux de LDL (Voight *et al.*, 2012). D'autres études ont vu le jour et ont montré que le taux de HDL (qu'il soit faible ou élevé) serait un marqueur de risque cardiovasculaire mais non un facteur causal (Mackey *et al.*, 2012). Plus encore que la quantité d'HDL, leur qualité serait déterminante dans le développement de pathologies métaboliques. En 2011, Khera *et al.*, ont montré que la capacité des HDL à induire l'efflux de cholestérol des macrophages était liée au développement de maladies coronariennes indépendamment du taux d'HDL total. Il semblerait d'ailleurs que les HDL de petites tailles et très riches en protéines induisent plus facilement les efflux de cholestérol que les autres particules de la même famille. De plus, tout comme les intempéries peuvent avoir une incidence sur la circulation des voitures, les fonctions des HDL peuvent être influencées par de nombreux facteurs externes génétiques ou environnementaux. Marc Gozlan fait donc cette merveilleuse comparaison : « ce n'est pas tant le nombre de camions qui importe que le professionnalisme des pompiers bien équipés ». En résumé, tous les sous-types d'HDL n'ont pas de propriétés antiathérogènes et antioxydantes et leur nombre ne fait pas leur force. Comme quoi, on l'a toujours dit, ce n'est pas la quantité qui compte mais la qualité...




PETIT LEXIQUE	
Lipoprotéines	
HDL:	high density lipoprotein
LDL:	low density lipoprotein
Lipides	
AG:	acide gras
CE:	cholestérol estérifié
CL:	cholestérol libre
Enzymes	
CETP:	cholesteryl ester transfer protein
LCAT:	lecithin cholesterol acyltransferase
PLTP:	phospholipid transfer protein
Récepteurs / Transporteurs	
ABCA1:	ATP-binding cassette sub-family A member 1
ABCG1:	ATP-binding cassette sub-family G member 1
LDLR:	low density lipoprotein receptor
SR-BI:	scavenger receptor class B type I

Figure 13. Métabolisme des HDL: voie de transport inverse du cholestérol. ApoA-I est produite et sécrétée en majorité par les hépatocytes et les entérocytes. Elle interagit avec ABCA1 et induit un efflux de CL pour produire des HDL naissantes discoïdes. D'autres cellules expriment ABCA1, comme les macrophages, et peuvent induire un efflux de CL sur l'apoA-I libre. Les HDL naissantes passent dans la circulation sanguine et sont enrichies en CL par les cellules périphériques *via* ABCG1, pour produire des HDL de type 2 (HDL2). ABCG1 est également exprimé par les entérocytes et les hépatocytes. Le CL contenu dans les HDL2 est estérifié par la LCAT pour produire des particules matures, les HDL3. Les HDL matures interagissent avec les hépatocytes grâce à SR-BI, qui permet un transfert sélectif du CE dans la cellule. Il en

résulte la formation d'HDL de petite taille qui retournent dans la circulation sanguine. Il existe également des mécanismes d'échanges de lipides entre les HDL matures et les LDL : le CE peut être transféré des HDL aux LDL par la CETP et les AG peuvent être transférés des LDL aux HDL par la PLTP.

3. ApoE : au delà du transport des lipides

Les apo échangeables sont les régulateurs du métabolisme des lipoprotéines (pour revue, voir Sundaram et Yao, 2012). ApoE en est le parfait exemple. A l'origine reconnue comme un acteur majeur du métabolisme et de la clairance des lipoprotéines (Shore et Shore, 1973), apoE a été ensuite caractérisée comme régulateur de processus biologiques aussi variés que l'homéostasie du cholestérol et des TG, les fonctions cognitives, et l'immunorégulation (**voir encadré**). Les différentes isoformes de la protéine ont également identifié comme des facteurs de risque dans le développement de maladies métaboliques (athérosclérose), de pathologies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) et de maladies infectieuses (HCV, HIV).



Rôle non conventionnel d'apoE

ApoE est connue pour son rôle primordial dans le transport des lipides. Cependant, elle possède de nombreux rôles non conventionnels. En effet, apoE influence de nombreux aspects de la réponse immunitaire et inflammatoire. ApoE peut notamment inhiber la prolifération des LT CD4⁺ et CD8⁺ par des récepteurs non conventionnels, distincts du LDLR (Kelly *et al.*, 1994 ; Jofre-Monseny *et al.*, 2008). Elle régule également l'expression de plusieurs cytokines comme l'IL12 et le TNF- α . De plus, apoE contrôle la réponse inflammatoire en inhibant la production de monoxyde d'azote (NO) (Zhang *et al.*, 2011).

a) Relations structure-fonction

Parce que les fonctions d'une protéine sont dictées par sa structure, il est nécessaire de comprendre les propriétés physiques d'apoE et de ses isoformes. ApoE est une glycoprotéine soluble de 299 acides aminés (34kDa). Elle est produite et sécrétée en majorité par les hépatocytes mais également par plusieurs types cellulaires comme les macrophages, les astrocytes, et les adipocytes (Huang et Mahley, 2014).

ApoE est formée de 2 domaines structuraux, un à chaque extrémité de la molécule, séparés par une région charnière (Wetterau *et al.*, 1988) (**Figure 14**). La partie Nter est formée de 4 hélices α antiparallèles et renferme le domaine de liaison aux récepteurs de la superfamille du LDLR et aux HSPG. Seule l'apoE associée aux lipides peut lier le LDLR avec une forte affinité, l'apoE libre n'étant que peu affine (Hatters *et al.*, 2006). Comme toutes les apo échangeables, apoE possède en Cter un domaine de liaison aux lipides amphipathique, riche en hélices α , lui permettant de passer de manière réversible d'une forme liée aux lipoprotéines sanguines à une forme libre. (Saito *et al.*, 2004, Hatters *et al.*, 2006). Bien que la structure de la partie N terminale (Nter) ait été résolue dès 1991 (Wilson *et al.*, 1991), la résolution de la partie Cter a été freinée car la forme libre d'apoE

forme des polymères en interagissant par la partie Cter (Garai et Frieden, 2010). Il fallut attendre 2011 pour que la structure entière de la protéine soit résolue (Chen *et al.*, 2011 ; Hsieh et Chou, 2011).

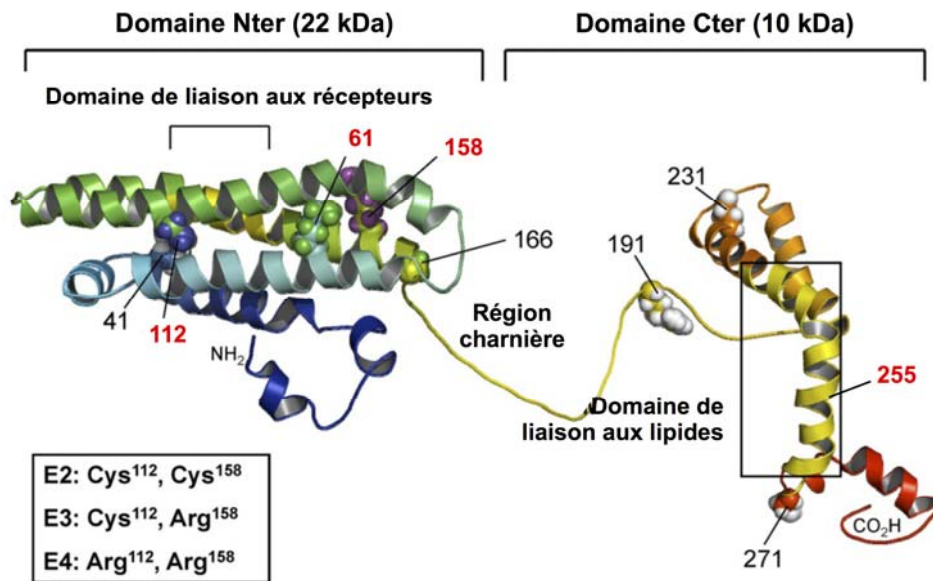


Figure 14. Structure de l'apoE libre humaine. Le domaine Nter de la protéine est formé de 4 hélices α antiparallèles et contient le domaine de liaison aux récepteurs (LDLR, LRP1, HSPG), situé sur l'hélice 4 (vert-foncé). Le domaine Cter, formé d'hélices α amphipathiques, renferme le domaine de liaison aux lipides. Les deux domaines Nter et Cter sont séparés par une région charnière. Les résidus 112 et 158 diffèrent en fonction des isoformes de la protéine. La forme sauvage possède les résidus Cys112 et Arg158. Dans la forme apoE2 le résidu Arg158 est substitué par une cystéine, ce qui change la conformation du domaine Nter et réduit considérablement l'interaction avec les récepteurs d'apoE. Dans la forme apoE4 le résidu Cys112 est substitué par une arginine, ce qui modifie également la structure et induit la formation d'un domaine d'interaction supplémentaire entre Arg61 et Glu255. Figure adaptée de Hsieh et Chou, 2011.

Chez l'Homme, apoE est retrouvée sous 3 isoformes majoritaires : apoE2, apoE3 et apoE4. ApoE3 est la plus répandue et correspond à la forme sauvage de la protéine tandis qu'apoE2 et apoE4 sont deux isoformes mutantes ne différant que par un seul acide aminé. Bien que subtiles, ces variations changent profondément la conformation de la protéine et donc ses fonctions. L'isoforme apoE2 possède une substitution du résidu Arg158 par une cystéine perturbant la structure du domaine de liaison aux récepteurs en Nter et diminuant fortement l'affinité de la protéine pour le LDLR (moins de 2% de la capacité de liaison en comparaison à la forme majoritaire apoE3) (Figure 14). Cette faible affinité a pour conséquence un défaut d'élimination des lipoprotéines sanguines et le développement de pathologie comme l'hyperlipoprotéïnémie de type III. L'isoforme apoE4 possède une substitution du résidu Cys112 par une arginine, avec pour conséquence une déstabilisation de la protéine et la formation d'un domaine d'interaction supplémentaire entre les résidus

Arg61 et Glu255 présent dans le domaine de liaison aux lipides en Cter (**Figure 14**). Bien qu'ayant une affinité de liaison au LDLR semblable à la forme sauvage, apoE4 est impliquée dans le développement de pathologies métaboliques comme l'athérosclérose. En effet, apoE4 se lie préférentiellement aux VLDL plutôt qu'aux HDL. Elle inhibe ainsi le processus de lipolyse des VLDL dans le sang, réduit leur clairance et augmente la quantité de cholestérol circulant. De plus, l'instabilité de la forme apoE4 nuit aux propriétés neuroprotectrices d'apoE dans le cerveau et induit le développement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Hatters *et al.*, 2006). Le développement de telles pathologies, dû à un seul changement dans la séquence de la protéine, illustre parfaitement le rôle-clé d'apoE dans de nombreux processus physiopathologiques.

b) Rôle d'apoE dans le métabolisme des lipoprotéines

Métabolisme des TRL

Un des principaux rôles d'apoE est le transport des lipides dans le sang vers les organes. Pour la majeure partie, l'apoE biologiquement active se trouve liée aux lipoprotéines. Elle est notamment présente à la surface des TRL : les CM, les VLDL et leur résidus de dégradation (CM *remnants* et IDL respectivement). ApoE se lie avec une forte affinité aux HSPG, au LDLR et au LRP1 et promeut ainsi la capture des TRL principalement par les hépatocytes (Feingold et Grunfeld, 2015). Dans une moindre mesure, apoE existe sous une forme libre sécrétée majoritairement par les hépatocytes et les macrophages (Oram *et al.*, 1996 ; Tokuda *et al.*, 2000 ; Okoro *et al.*, 2012). L'apoE libre permet d'enrichir les *remnants* des TRL en apoE et ainsi de faciliter leur élimination par le foie (Feingold et Grunfeld, 2015). Le rôle de cette apoE libre reste cependant peu connu. **L'étude du rôle de l'apoE libre dans le métabolisme des lipoprotéines a constitué une partie de ce travail de thèse (voir Crouchet *et al.*, Gut, 2016)**. ApoE peut également influencer le métabolisme des TRL au delà de ses propriétés de ligand. Une forte production d'apoE augmente la synthèse et la sécrétion de VLDL. De plus, une concentration élevée d'apoE dans le sang induit une accumulation de cette dernière à la surface des VLDL et réduit considérablement leur dégradation en provoquant un déplacement de l'apoCII, l'activateur de la LPL (Huang *et al.*, 1999 ; Phillips, 2014). Ainsi, apoE régule à la fois le catabolisme et l'anabolisme des TRL et est donc un important régulateur du taux de TG sanguins et intracellulaires (Phillips, 2014).

Métabolisme des HDL

ApoE est aussi retrouvée à la surface de certaines classes de HDL, incluant de larges particules où elle est la seule apo représentée, et des particules où apoE est associée à apoAI. ApoE est donc un acteur majeur de la voie de transport inverse du cholestérol. Deux voies cellulaires majeures permettent la production d'apoE-HDL. D'une part, il a été démontré que, comme apoAI, apoE libre ou faiblement lipidée peut interagir avec ABCA1 et induire un efflux de CL pour générer des HDL discoïdes. Ces dernières sont maturées en particules sphériques par l'action combinée d'ABCG1 et de la LCAT (Kyriakos *et al.*, 2007). D'autre part la formation d'apoE-HDL peut résulter du recyclage d'apoE lors de la clairance des TRL (Heeren *et al.*, 2007 ; Getz et Reardon, 2009). Ce mécanisme est décrit dans la **figure 15**.

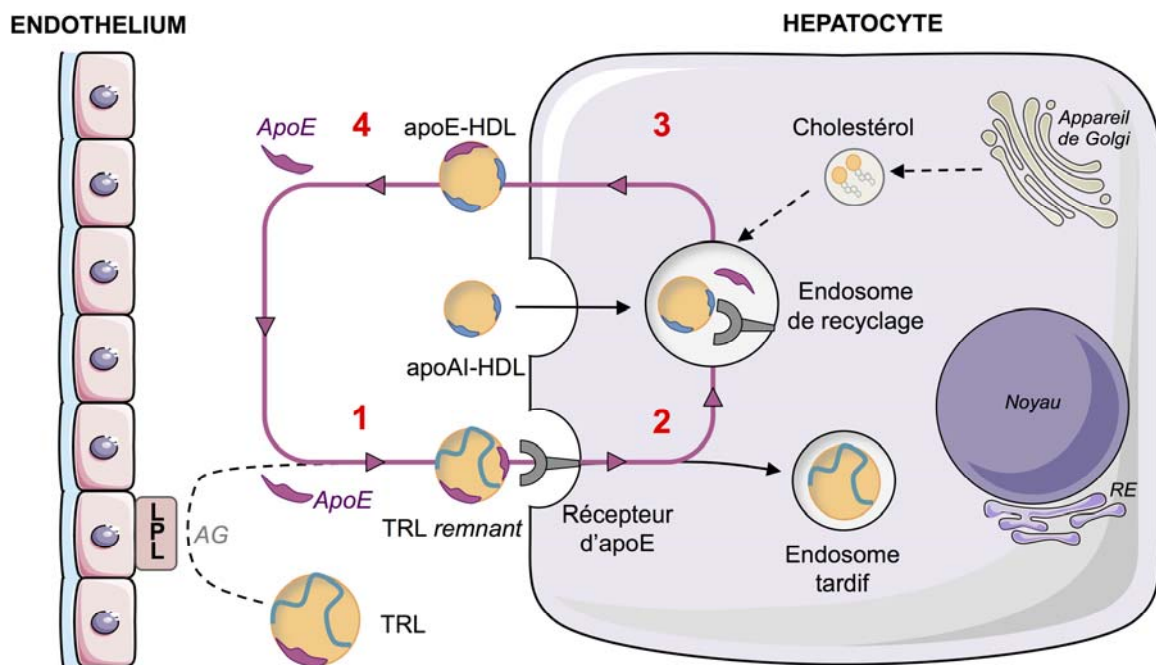


Figure 15. Le recyclage d'apoE induit la formation d'HDL. (1) Dans la circulation, les TRL sont dégradés par la LPL pour libérer des AG. Les *remnants* sont enrichis en apoE provenant des HDL et rapidement internalisés *via* l'interaction d'apoE avec ses récepteurs (LDLR, LRP1, HSPG). (2) Une fois internalisés, les *remnants* sont dissociés dans les endosomes précoces (non détaillé) et les différents composants sont triés. Alors que la partie lipidique de la particule et l'apoB sont dirigées vers les endosomes tardifs pour être dégradés, l'apoE et son récepteur sont dirigés vers les endosomes de recyclage. (3) La rétention d'apoE provoque une mobilisation du CL intracellulaire vers les endosomes de recyclage. De plus, les apoAI-HDL internalisées par le foie seront également dirigées vers les endosomes contenant apoE. Il en résulte la formation d'apoE-HDL et un efflux de cholestérol. (4) Les apoE-HDL sécrétées peuvent à leur tour faciliter l'enrichissement des *remnants* en apoE pour améliorer leur clairance par le foie, complétant ainsi le cycle de recyclage d'apoE.

c) Quand apoE devient l'ennemie : développement des maladies métaboliques

ApoE est considérée comme un facteur anti-athérosclérotique. Son rôle protecteur paraît évident au regard des multiples rôles d'apoE dans le métabolisme physiologique des lipoprotéines. Cependant, son bénéfice dépend grandement de sa concentration plasmatique et de l'isoforme de la protéine. Un seul changement dans la structure d'apoE provoque des maladies métaboliques graves. Les isoformes apoE2 et apoE4 en sont les meilleurs exemples car elles accélèrent le développement de pathologie comme l'hyperlipoprotéïnémie de type III et l'athérosclérose (Heeren *et al.*, 2007 ; Getz et Reardon, 2009).

ApoE2 et l'hyperlipoprotéïnémie de type III

L'hyperlipoprotéïnémie de type III (HLP III) est l'une des 5 HLP familiales décrites par Fredrickson (Fredrickson *et al.*, 1967). Il s'agit d'une pathologie métabolique caractérisée par des taux élevés de cholestérol et de TG plasmatiques, typiquement supérieurs à 300 mg/dL (les normes étant situées respectivement entre 160 et 200 mg/dL et entre 35 et 150 mg/dL, respectivement). Cette pathologie prédispose au développement précoce de l'athérosclérose. L'expression de l'isoforme mutée apoE2 chez les patients atteints est une des anomalies métaboliques majeures accélérant le développement de cette pathologie. En effet, la faible affinité d'apoE2 pour le LDLR diminue très largement la clairance plasmatique des TRL et de leur *remnants*. De plus, cette affection est également caractérisée par la présence de VLDL anormales (β -VLDL), très enrichies en cholestérol, en TG et en apoE2. L'accumulation d'apoE2 sur ces VLDL diminue leur catabolisme avec pour conséquences leur accumulation dans le sang et une nette diminution de la production de LDL (le produit final de la chaîne de dégradation des VLDL). Les β -VLDL étant hautement athérogènes, apoE2 augmente les risques de maladies cardio-vasculaires (Phillips, 2014 ; Mahley, 2016). Toutefois, apoE2 n'est pas seule responsable de la maladie qui est multifactorielle ; l'HLP III ne se déclare que chez les patients homozygotes pour apoE2 ayant d'autres facteurs de risques génétiques et environnementaux comme l'âge, l'obésité ou une alimentation riche en graisses (Phillips, 2014).

ApoE4 et athérosclérose : liaison dangereuse avec les VLDL

Contrairement à apoE2, apoE4 est très affine pour le LDLR. Cependant, elle est associée à de fort taux de LDL-cholestérol plasmatiques et des risques d'athérosclérose. Ce

phénomène serait dû à une préférence d'apoE4 pour les VLDL plutôt que pour les HDL. ApoE4 possède un domaine d'interaction supplémentaire, par rapport à la forme apoE3, entre le domaine Nter (Arg61) et le domaine de liaison aux lipides en Cter (Glu255), ce qui modifie la structure de la protéine. Ce domaine d'interaction est responsable de son association préférentielle aux VLDL (Hatters *et al.*, 2005). En effet, inhiber cette interaction par des petites molécules (nommées ApoE4SC pour *apoE4 structure corrector*) ou par mutagenèse permet un shift d'apoE4 des VLDL aux



ApoE4 et neurobiologie

ApoE joue un rôle primordial dans le cerveau où elle régule la synaptogenèse, la plasticité neuronale, la croissance et la réparation des neurones en assurant l'homéostasie du cholestérol (Hauser *et al.*, 2011). ApoE est également impliquée dans l'élimination du peptide β -amyloïde (A β) par les neurones. L'accumulation du peptide A β dans le cerveau, connue sous le nom de plaque sénile, est l'une des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (AD). Il a été démontré que l'isoforme apoE4 était impliquée dans le développement de l'AD car contrairement à apoE3, sa structure particulière empêchait la liaison au peptide A β et son élimination (Hauser et Ryan, 2013). De plus, apoE4 en elle-même a de nombreux effets délétères sur les neurones en induisant des perturbations du métabolisme du cholestérol dans le cerveau (Mahley 2016).

HDL et d'obtenir une protéine aux fonctions similaires à apoE3 (Dong et Weisgraber, 1996 ; Mahley, 2016). Le rôle d'apoE4 dans le développement de l'athérosclérose est encore peu connu. Néanmoins, il semblerait qu'apoE4 réduise la clairance des *remnants* de VLDL et diminue la production d'apoE-HDL (Heeren *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2013 ; Mahley, 2016). Comme décrit précédemment, apoE3 peut être recyclée pour produire des HDL et stimuler un efflux de cholestérol. A l'inverse, apoE4 s'accumule dans les cellules et n'est pas recyclée de manière efficace, induisant un défaut de production des apoE-HDL et une accumulation de cholestérol intracellulaire. Enfin, l'accumulation de cholestérol dans les cellules réduit l'expression du LDLR et provoque une accumulation de LDL pro-athérogènes (Heeren *et al.*, 2007 ; Mahley, 2016).


Le développement de ces pathologies associées aux isoformes d'apoE démontre une fois de plus l'importance de cette protéine dans la régulation du métabolisme lipidique.

VI. Le virus de l'hépatite C

1. Classification

Le HCV appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre des *Hepacivirus* (**Figure 16**) (**voir encadré**). La famille des *Flaviviridae* comprend également les genres *Flavivirus* (incluant le virus de la dengue, le virus West Nile, le virus de la fièvre jaune, le virus Zika...), les *Pestivirus* (par exemple le virus de la fièvre porcine), et les *Pegivirus* (représenté par le virus de

l'hépatite G). Les variants du HCV sont regroupés en 7 génotypes principaux et en nombreux sous-types. Bien que ces génotypes présentent de grandes différences génétiques et une distribution géographique variable, ils sont considérés comme une seule espèce par les règles actuelles de l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Deux autres espèces sont retrouvées dans le genre des *Hepacivirus* : le GB virus B (GBV-B), isolé chez le tamarin, et le *non-primate hepacivirus* (NPHV), très récemment découvert chez le cheval (**Figure 16**). La présence du NPHV chez le chien reste encore incertaine (Simmonds, 2013)



Classification des virus

De nos jours, l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) fixe la classification des virus en ordres (-*virales*), familles (-*viridae*), genres (-*virus*) et espèces. Historiquement, il existe une autre classification des virus, non phylogénétique, mise au point par David Baltimore (Prix Nobel de Médecine en 1975). Les virus y sont classés en fonction de la nature de leur génome et de son mode d'expression. En suivant cette classification, HCV appartient au groupe IV, regroupant les virus à ARNs de polarité positive.

2. La curieuse nature de la particule virale du HCV

Avant le développement du modèle d'étude HCVcc (voir chapitre « Modèle d'étude du HCV), la caractérisation des particules virales du HCV a été réalisée à partir de virus isolés de chimpanzés ou de patients chroniquement infectés. Ces études ont révélé que les particules virales possédaient une densité située entre 1,03 et 1,20 g/cm³. Alors que les particules de haute densité sont souvent peu infectieuses, les particules de faible densité (de 1,03 à 1,10 g/cm³) correspondent aux formes virales les plus infectieuses. (Bradley *et al.*, 1991 ; Pumeechockchai *et al.*, 2002 ; Catanese *et al.*, 2013). Cette particularité surprenante, également observée par la suite en culture cellulaire, est en réalité due à l'association du virus aux lipoprotéines (Thomssen *et al.*, 1992 ; André *et al.*, 2002 ; Lindenbach *et al.*, 2006). En effet, certaines apo comme apoB, apoE, apoAI et apoC sont associées aux particules virales du HCV (Chang *et al.*, 2007 ; Gastaminza *et al.*, 2008 ; Meunier *et al.*, 2008 ; Catanese *et al.*, 2013).

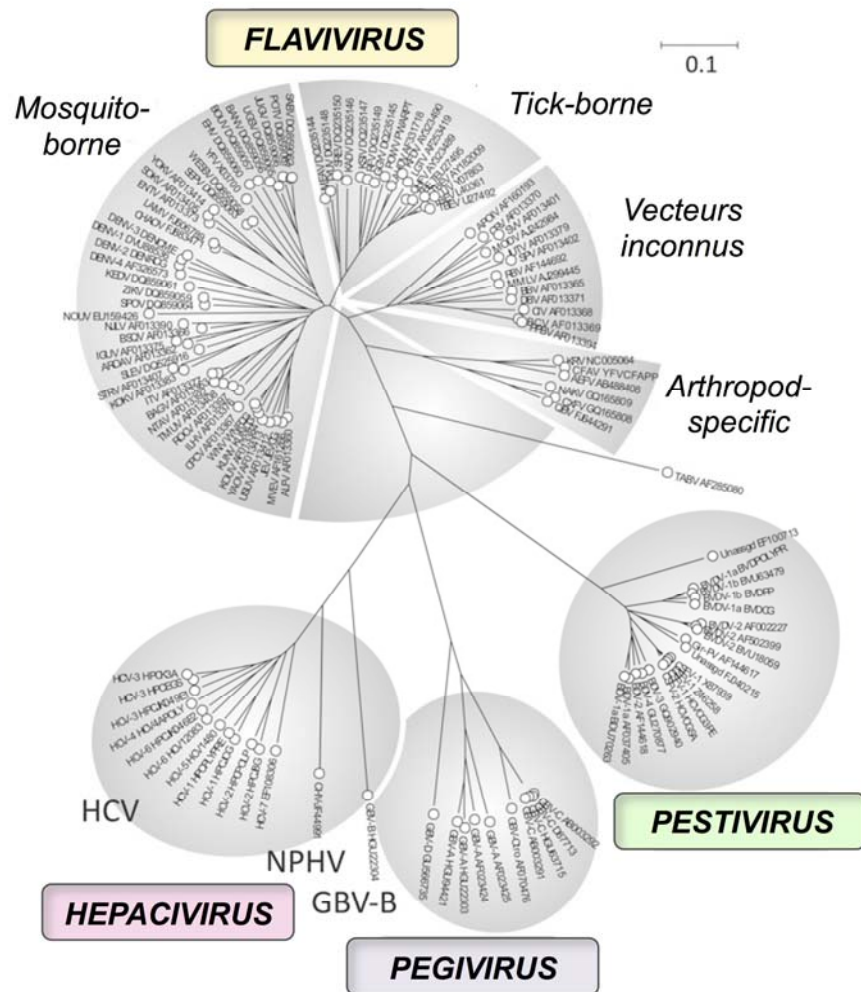


Figure 16. Arbre phylogénétique de la famille des *Flaviviridae*. La famille des *Flaviviridae* comprend quatre genres : les *Flavivirus* classés en fonction des vecteurs de transmission, les *Pestivirus*, les *Hepacivirus* et les *Pegivirus*, un genre très récemment découvert. L'arbre est basé sur la comparaison des séquences conservées de l'ARN polymérase de variants représentatifs au sein de chaque genre et espèce. L'arbre phylogénétique a été construit par « neighbour-joining ». Une divergence de 0,1, soit 10% de divergence des séquences en acides-aminés, est représentée sur la barre d'échelle. Figure adaptée de Simmonds, 2013.

De plus, l'analyse du profil lipidique des virions purifiés a montré qu'ils contenaient des taux de TG et de cholestérol similaires aux VLDL, IDL et LDL (Merz *et al.*, 2011). L'association des particules virales avec les lipoprotéines leur a valu le nom de lipo-viro-particule (LVP) (André *et al.*, 2002). Les LVP produites en culture cellulaire possèdent des densités plus élevées que les LVP isolées chez les patients infectés, avec un pic d'infectivité situé entre 1,10 et 1,15 g/cm³. Ces différences s'expliquent par le fait que les cellules Huh7 utilisées pour produire le virus *in vitro* ont un défaut de production de VLDL matures, dû à une faible efficacité de lipodation de l'apoB-100, et produisent donc des particules *VLDL-like* (Jammart *et al.*, 2013 ; Lindenbach *et al.*, 2016).

Les particules virales HCV possèdent un diamètre allant de 50 à 80 nm. En plus des composants spécifiques des lipoprotéines, elles contiennent les composants viraux classiques : un génome viral d'ARN simple brin (ARNsb) protégé par une capsidie icosaédrique formée par la protéine virale core avec laquelle il forme la nucléocapsidie. La nucléocapsidie est entourée d'une membrane lipidique nommée enveloppe virale provenant de la cellule hôte, dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (**Figure 17**) (Lindenbach, 2013 ; Popescu *et al.*, 2014). La nature exacte des interactions entre le virus et les composants des lipoprotéines reste peu connue. Une possibilité serait que les lipoprotéines s'associent de manière périphérique au virus *via* l'interaction entre les apo et les composants protéiques ou lipidiques de l'enveloppe virale. Une autre hypothèse serait que les LVP correspondent à des particules hybrides issues de la fusion entre le virus et les lipoprotéines, partageant une même enveloppe lipidique (**Figure 17**) (Bartenschlager *et al.*, 2011 ; Lindenbach, 2013).

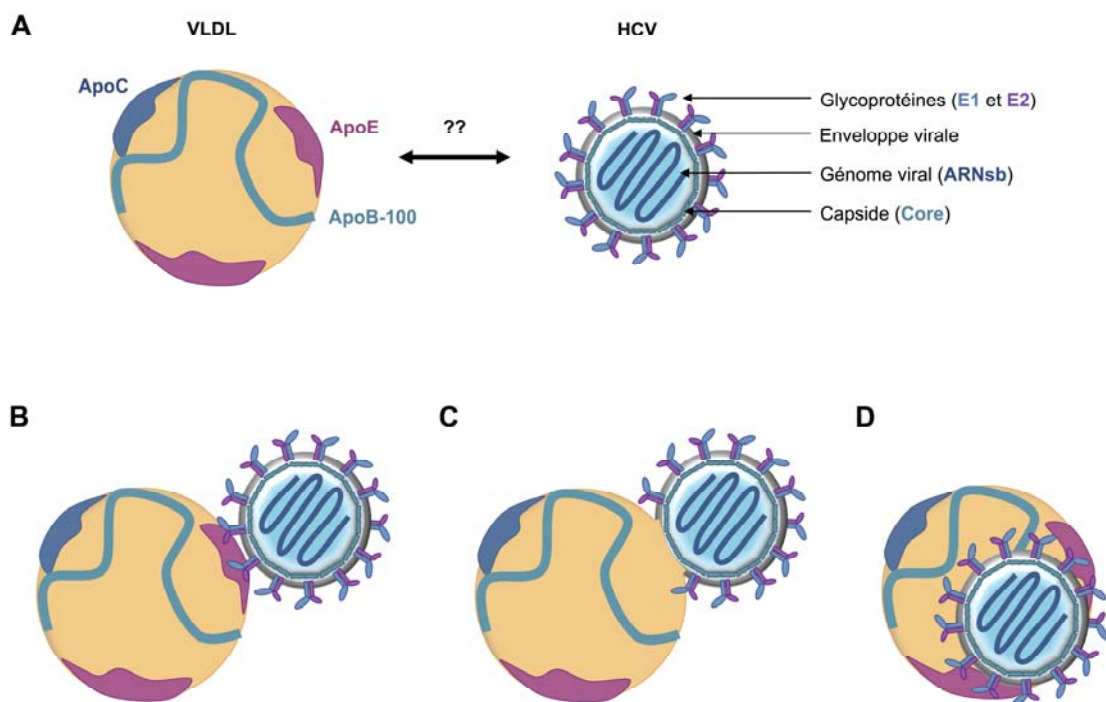


Figure 17. Structure schématique de la LVP. (A) La particule virale HCV est formée d'une capsidie icosaédrique, formée de la protéine core, renfermant le génome viral ARNsb et entourée d'une enveloppe dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines E1 et E2. Le virus est lié aux lipoprotéines sériques. L'exemple illustré est celui des VLDL. (B-D) Différents modèles d'interaction entre HCV et les VLDL. HCV pourrait s'associer aux VLDL *via* l'interaction entre les apo et les glycoprotéines d'enveloppe (B) ou par les composants lipidiques de son enveloppe (C). La LVP pourrait également correspondre à un complexe hybride entre le virus et la VLDL (D).

3. Organisation génomique

Le génome du HCV est un ARNs_b de polarité positive d'environ 9,6 kb. Il est constitué d'un seul ORF (*open reading frame* ou cadre de lecture ouvert) flanquée par deux régions non traduites très structurées en 5' et 3' (**Figure 18**) (Moradpour et Penin, 2013).

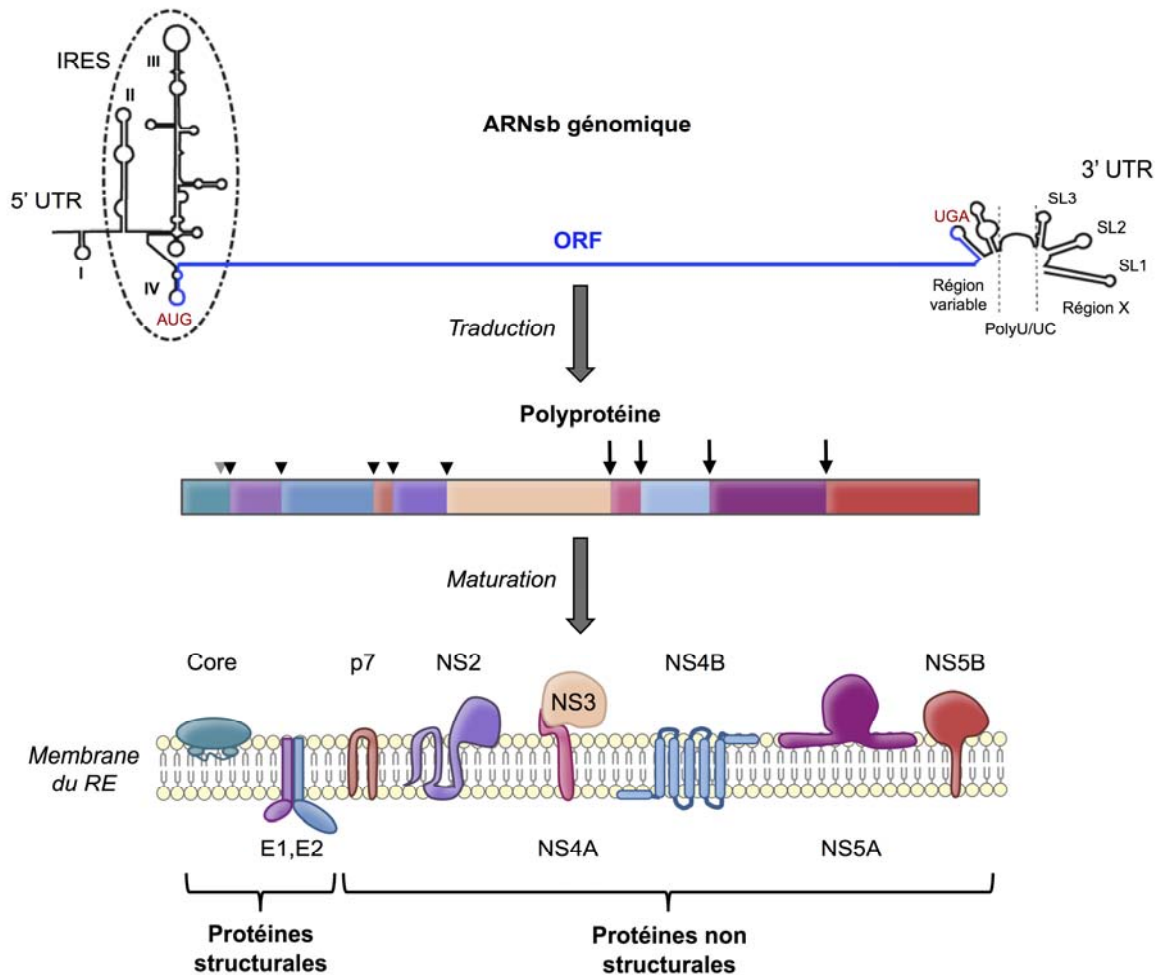


Figure 18. Organisation génétique du HCV et maturation de la polyprotéine virale. Le génome ARNs_b de 9,6 kb du HCV est schématisé ci-dessus. La région 5' UTR contient un IRES dictant la traduction de la polyprotéine virale. La région 3' UTR comprend 3 régions : une région variable, une région polyU/UC et la région X, très conservée et structurée en 3 tiges-boucles (stem-loop, SL). Le génome contient un seul cadre de lecture ouvert (ORF) codant une polyprotéine allant de la région Core à la région NS5B. Celle-ci est maturée par les *signal-peptidases* du RE (triangles noirs) et par la protéase virale NS3/NS4A après son auto-clivage (flèches noires) en 10 protéines. Le triangle gris correspond au site de maturation de la protéine core par une *signal-peptide-peptidase* cellulaire. Toutes les protéines virales sont ancrées directement au niveau de la membrane du RE, à l'exception de NS3. Il est à noter que la maturation de la polyprotéine a lieu de manière co- et post-traductionnelle.

La région 5'UTR (*untranslated region*) est très conservée parmi les différents génotypes du HCV. Elle est formée de quatre domaines majeurs structurés en tige-boucles et

renferme un IRES (domaines II à IV) dictant la traduction de la polyprotéine virale par un mécanisme coiffe-indépendant (Fukushi *et al.*, 1994). De plus, le domaine I, en amont de la structure IRES, joue un crucial dans la réplication de l'ARN viral (Friebe *et al.*, 2001). La région 3' UTR, est composée de 3 régions distinctes : une région variable (30 à 50 nt) et donc peu conservée parmi les génotypes, une région riche en uracile/pyrimidine (20 à 200 nt en fonction des génotypes) nommée région polyU/UC, et la région X, très structurée et très conservée (98 nt) (Moradpour et Penin, 2013). Ces structures jouent un rôle clé à la fois dans la réplication et dans la traduction virale (Kolykhakov *et al.*, 1996 ; Badrick *et al.*, 2006 ; Song *et al.*, 2006).

4. Les protéines virales

Comme décrit dans la **figure 18**, la polyprotéine générée par traduction IRES-dépendante est maturée par les protéases cellulaires et virales en 10 protéines virales: les protéines structurales Core, E1 et E2, la viroporine p7 et les protéines non-structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B impliquées dans le cycle réplcatif du virus.

a) Core

Lors de l'étape de traduction, une séquence-signal interne, localisée entre Core et E1, permet la translocation de la polyprotéine à travers la membrane du RE. Le clivage de cette séquence-signal par la *signal-peptidase* du RE permettra de libérer une forme immature de la protéine Core de 191 acides aminés (aa). Par la suite, la protéine Core mature (177 aa) sera générée par un second clivage en Cter par une *signal-peptide-peptidase* (Santolini *et al.*, 1994 ; Yasui *et al.*, 1998 ; McLauchlan *et al.*, 2002 ; Okamoto *et al.*, 2004). La protéine Core mature est composée de deux domaines : un domaine de liaison à l'ARN en Nter (domaine I), et le domaine de liaison aux membranes en Cter (domaine II) (**Figure 19**) (Boulant *et al.*, 2005). Core s'oligomérisse grâce au domaine I et interagit avec l'ARN génomique du HCV pour former la nucléocapside. De plus, elle agit comme une chaperonne lors de l'encapsidation de l'ARN (Klein *et al.*, 2001 ; Cristofari *et al.*, 2004 ; Boulant *et al.*, 2005). Le domaine I est également impliqué dans l'interaction de Core avec de nombreux facteurs de la cellule hôte, influençant ainsi de nombreuses fonctions cellulaires (de Chasse *et al.*, 2008). En affectant la transcription de certains gènes, les voies de signalisation cellulaires comme la voie JAK/STAT, l'inflammation, l'apoptose et même le métabolisme des lipides, Core serait le principal acteur viral lié au développement

de la stéatose et du CHC (**voir encadré**). (Moriya *et al.*, 1998 ; Kanda *et al.*, 2013 ; Roingeard 2013). Récemment, Core a notamment été incriminée dans un mécanisme de régulation épigénétique activant de manière aberrante la voie Wnt/ β -caténine, contribuant ainsi au développement de CHC agressifs (Quan *et al.*, 2014). Le domaine II de Core est formé de deux hélices amphipathiques permettant l'interaction de Core avec les phospholipides des membranes cellulaires et son association avec les GL (**Figure 19**) (Boulant *et al.*, 2006). En 2007, plusieurs

études ont démontré que des mutations de Core inhibant sa liaison au GL inhibait également la production de particules virales infectieuses du HCV, indiquant que l'interaction entre Core et les GL est essentielle à l'assemblage viral (Boulant *et al.*, 2007 ; Miyanari *et al.*, 2007 ; Shavinskaya *et al.*, 2007).

Core accusée à tort ?

Une particularité de la région codant la protéine Core est l'existence d'un cadre de lecture alternatif générant des protéines additionnelles regroupées sous le nom protéines Core+1 ou ARFP (pour *alternative reading frame protein*). Leur rôle dans le cycle viral et la pathogenèse du HCV reste encore peu connu. Cependant, il a été observé que les protéines ARFP sont surexprimées chez les patients présentant une cirrhose hépatique avancée ou un CHC, suggérant que ces protéines pourraient être impliquées dans l'oncogenèse. Plusieurs spéculations sont nées de ces études notamment le fait que les protéines ARFP pourraient contrôler le cycle cellulaire et induire la prolifération des hépatocytes qui, s'ils demeuraient quiescents, ne répliqueraient pas efficacement HCV. En réalité, il se pourrait que les protéines ARFP soient responsables d'une partie des effets attribués à la protéine Core (pour revue, voir Branch *et al.*, 2005)

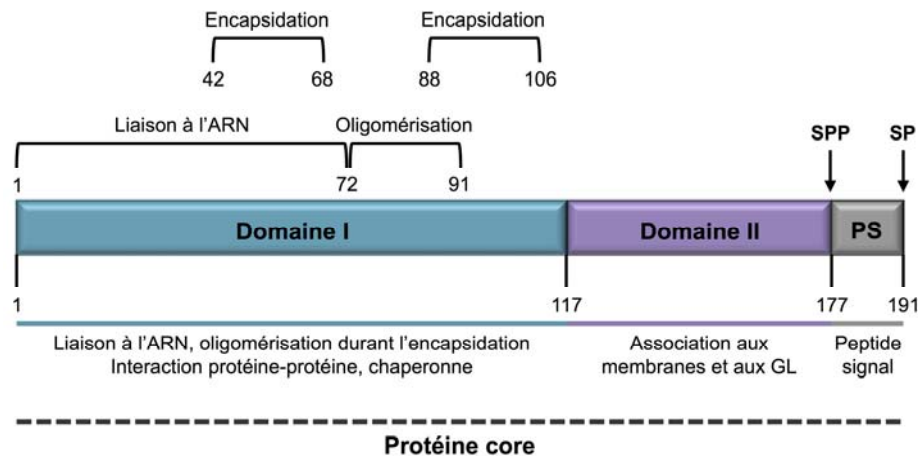


Figure 19. Représentation schématique de la protéine de capsid Core. La protéine Core mature (177 aa) est générée suite à l'action de la *signal-peptidase* (SP) et la *signal-peptide peptidase* (SPP) dans le RE. Elle est constituée de 2 domaines I et II. Le domaine I (1-177) contient les régions de liaison à l'ARN, d'oligomérisation et d'encapsidation de l'ARN viral, nécessaires à la formation des nucléocapsides. Le domaine II permet l'association aux membranes et aux gouttelettes lipidiques (GL) lors de l'assemblage des particules virales infectieuses du HCV. Figure inspirée de Gawlik et Gally, 2014.

b) Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines E1 et E2 sont les protéines structurales majeures exprimées à la surface des particules virales. Elles jouent un rôle-clé à la fois dans l'entrée virale et dans l'assemblage des nouveaux virions. Structurellement, il s'agit de 2 protéines transmembranaires de type I, possédant un ectodomaine en Nter (160 aa pour E1 et 360 aa pour E2) et un court domaine transmembranaire (DTM) en Cter d'environ 30 aa. Les DTM sont riches en aa hydrophobes et contiennent un signal de translocation permettant aux glycoprotéines d'être transloquées à la membrane du RE durant leur synthèse, et d'y être ancrées. Ils permettent également l'interaction des 2 protéines et la formation d'un hétérodimère non covalent (Cocquerel *et al.*, 2002 ; Voisset et Dubuisson, 2004).

Le développement du modèle HCVcc a permis d'étudier plus en détails l'association fonctionnelle d'E1 et E2 sur les particules virales infectieuses. Il a été observé que l'hétérodimère E1-E2 associé au virus portait de nombreuses N-glycosylations (6 et 11 sites de glycosylation pour E1 et E2 respectivement), indiquant que la particule virale est maturée et transite par l'appareil de Golgi. Les glycosylations sont indispensables au bon repliement de E1 et E2 et représentent près de 50% du poids moléculaire de leur ectodomaine (Kong *et al.*, 2013). Comme décrit précédemment, ces nombreuses glycosylations participent à l'échappement aux nAbs (Falkowska *et al.*, 2007). De plus, il a été observé que contrairement aux glycoprotéines ancrées au RE, E1 et E2 sont liées par des ponts disulfures à la surface du virus. Ces observations indiquent que le complexe E1-E2 subit plusieurs maturations lors de la productions des particules virales infectieuses pour former un hétérodimère fonctionnel (Vieyres *et al.*, 2010). Une autre caractéristique des glycoprotéines d'enveloppe est leur très grande variabilité. En effet, les régions HVR1 et HVR2 d'E2 peuvent varier jusqu'à 80% et 100% respectivement entre les différentes souches virales et constituent donc, au même titre que les nombreuses glycosylations, un facteur majeur d'échappement aux nAbs chez les patients infectés (Von Hahn *et al.*, 2007 ; Prentoe *et al.*, 2011 Fafi-Kremer *et al.*, 2012).

Le repliement et la maturation des glycoprotéines E1 et E2 sont des processus complexes, lents et interdépendants, nécessitant l'intervention de plusieurs protéines chaperonnes du RE. Pour cette raison, leur surexpression induit très souvent la production de protéines mal repliées et d'agrégats entravant considérablement leur caractérisation structurale. De ce fait la structure 3D des glycoprotéines E1 et E2 demeure irrésolue (Khan *et al.*, 2015). En 2010, une étude présenta un modèle de la structure de l'ectodomaine d'E2,

basé sur la connaissance des glycoprotéines des autres membres de la famille des *Flaviviridae*. Les auteurs proposèrent une structure divisée en 3 domaines principaux DI, DII et DIII. Ce modèle décrit également E2 comme une protéine de fusion de classe deux, c'est à dire contenant un peptide de fusion interne dans sa séquence, démasqué à pH acide dans les endosomes lors de l'entrée virale (Bressanelli *et al.*, 2004 ; Krey *et al.*, 2010).

Récemment, la cristallisation de l'ectodomaine d'E2 a permis une avancée considérable dans la compréhension de la structure 3D d'E2 (**Figure 20**) (Kong *et al.*, 2013 ; Khan *et al.*, 2014). Ces études ont révélé des faits plutôt inattendus. Contrairement au modèle prédit, E2 possède une structure globulaire compacte à 4 domaines principaux, très différente des structures observées chez les autres virus de la famille des *Flaviviridae*. De plus, E2 n'appartiendrait pas à la famille des protéines de fusion de classe II. Lorsque ces protéines sont exposées à des pH acides, elles subissent des réarrangements dans leur structure pour permettre l'exposition du peptide de fusion et ainsi induire la fusion membranaire. Or, l'ectodomaine d'E2 ne subit pas de changements structurels majeurs quand il est exposé à de faibles pH (Kong *et al.*, 2013 ; Khan *et al.*, 2014 ; Khan *et al.*, 2015).

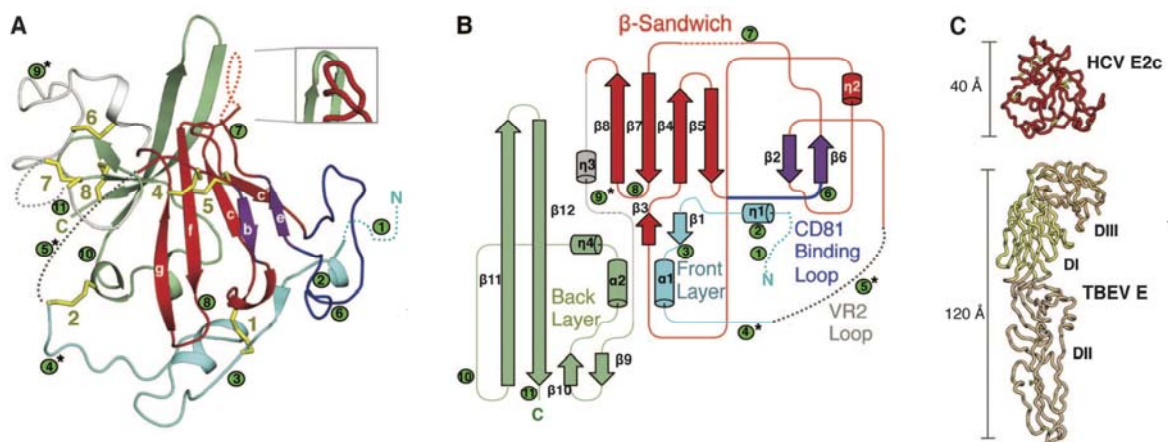


Figure 20. Structure 3D de l'ectodomaine d'E2 et comparaison avec une protéine de fusion de classe II. (A-B) Structure 3D de l'ectodomaine d'E2 et sa représentation schématique (même code couleur). Les 4 domaines principaux sont représentés en vert, rouge, bleu et violet. Le site de liaison au CD81 correspond à une structure en boucle bilobée (violet). Les régions variables sont représentées en blanc. Les bandes jaunes correspondent aux ponts disulfures et les ronds verts aux sites de glycosylations. Les structures en pointillés sont des structures désordonnées. **(C)** Comparaison de la structure de l'ectodomaine d'E2 avec la protéine de fusion de classe II (E) du *Tick Borne Encephalitis Virus* (TBEV), un autre membre de la famille des *Flaviviridae*. Figure adaptée de Kong *et al.*, 2013.

En 2014, El Omari *et al.*, ont cristallisé le domaine Nter de la glycoprotéine E1 (nE1). Tout comme l'ectodomaine d'E2, la structure de nE1 réserve son lot de surprises. De

manière surprenante, la protéine est structurée en homodimères reliés par des ponts disulfures et ne possède aucune ressemblance avec d'autres protéines de fusion virales (**Figure 21**). Le fragment nE1 possède plutôt des similitudes avec des protéines liant les stéroïdes ou d'autres molécules dérivées, fait intéressant lorsque l'on sait que le cycle viral du HCV et le métabolisme des lipides sont étroitement liés (El Omari *et al.*, 2014 ; Khan *et al.*, 2015). Au vu de ces résultats, le processus de fusion membranaire des glycoprotéines d'enveloppe du HCV avec les membranes des endosomes pourrait être très différent de celui décrit jusqu'alors.

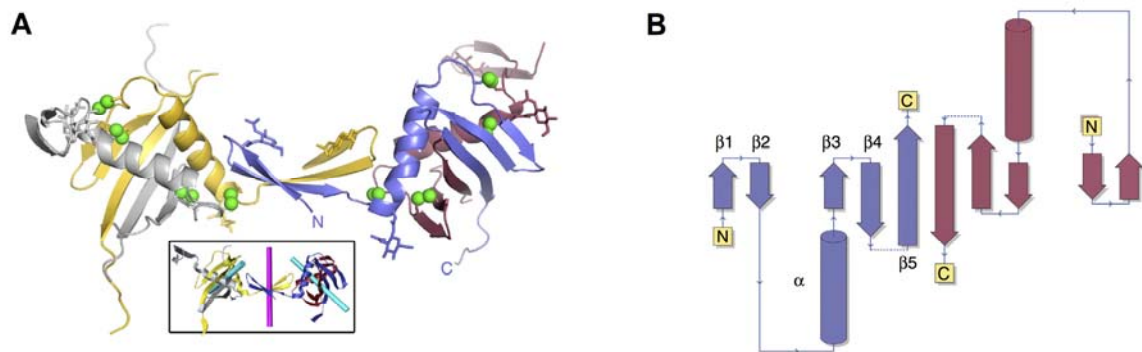


Figure 21. Structure 3D du domaine Nter d'E1 (nE1). (A) Représentation de la structure 3D d'un dimère de nE1 ; nE1 étant elle-même organisée en dimères covalents reliés par des ponts disulfures (ronds verts). Chaque monomère est coloré différemment. Les barres représentent les sites de glycosylation. (B) Représentation schématique de la structure 3D de nE1 (même code couleur). Figure adaptée de El Omari *et al.*, 2014.

c) La viroporine p7

P7 est une protéine intégralement membranaire, composée de deux hélices α transmembranaires insérées dans la membrane du RE et connectées entre-elles par 2 boucles cytosoliques (Carrère-Kremer *et al.*, 2002 ; Yamaga et Ou, 2002). P7 appartient à la famille des viroporines. Des études de microscopie électronique ont montré que p7 s'oligomérise en hexamères ou en heptamères stables pour former des canaux ioniques. La structure 3D de ces canaux révèle une architecture en « fleur » dont chaque monomère formerait un pétale orienté vers la lumière du RE. Ces canaux permettent le transport sélectif de cations (Luik *et al.*, 2009 ; Chandler *et al.*, 2012) (**Figure 22**).

A l'heure actuelle, le rôle exact de p7 dans le cycle viral demeure incertain. Les expériences réalisées *in vitro* avec des réplicons subgénomiques du HCV ne codant pas p7 ont d'ores et déjà démontré que p7 n'était pas nécessaire à la réplication virale (Lohmann *et al.*, 1999). Cependant, p7 s'avère indispensable à la production de particules virales infectieuses en agissant lors de l'assemblage et de la maturation de virions (pour revue,

voir Steinmann et Pietschmann, 2010). D'une part, il a été démontré que p7 agit de concert avec NS2 pour recruter E1-E2 lors des étapes précoces d'assemblage du virus, par un mécanisme encore inconnu (Jones *et al.*, 2007 ; Popescu *et al.*, 2011). D'autre part, en formant des canaux ioniques, p7 permettrait d'équilibrer le pH des vésicules de sécrétion et des endosomes lors de la maturation et la sécrétion des virus. Ainsi, p7 protégerait les virus naissants de changements conformationnels dus à des pH trop acides (Wozniak *et al.*, 2010). Enfin, une étude récente a également mis en évidence un nouveau rôle de p7 dans les étapes finales d'encapsidation de l'ARN viral par la protéine Core (Gentsch *et al.*, 2013). Au vu de l'importance de p7 pour les étapes tardives du cycle viral, l'utilisation de l'amantadine et de la rimantadine, deux drogues inhibant les fonctions de p7, pourraient constituer un potentiel traitement antiviral (Montserret *et al.*, 2010 ; OuYang *et al.*, 2013).

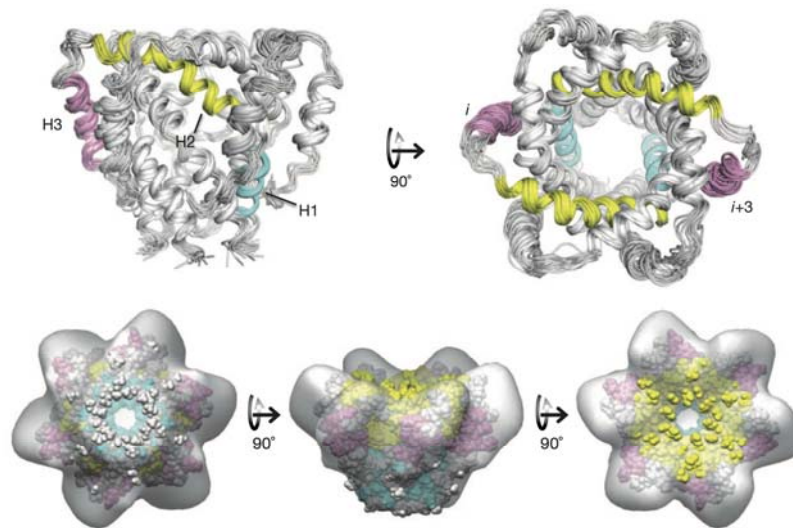


Figure 22. Structure 3D de p7 et du canal ionique hexamérique. La viroporine p7 s'oligomérise en hexamères pour former des canaux ioniques. La structure 3D a été résolue par RMN. Figure adaptée de OuYang *et al.*, 2013.

d) La protéine non structurale NS2

NS2 est une protéine membranaire renfermant 3 DTM en Nter et un domaine protéase à cystéine en Cter (**Figure 23**). Pour être fonctionnel, le domaine catalytique de NS2 doit être fusionné au site catalytique de NS3, pour former une protéase active (Lorenz *et al.*, 2006; Jirasko *et al.*, 2008; Schregel *et al.*, 2009; Jirasko *et al.*, 2010). Le seul substrat connu de la protéase NS2/NS3 est la jonction entre NS2 et NS3. Alors que NS2 n'est pas directement impliquée dans l'étape de réplication virale, son activité protéase est indispensable à la multiplication du virus car elle permet la maturation de la polyprotéine et à la libération de NS3 (Kolykhalov *et al.*, 2000 ; Welbourn *et al.*, 2005 ; Isken *et al.*,

2015). Au delà de son activité protéase, NS2 joue un rôle essentiel dans les étapes tardives de l'assemblage viral. Elle interagit avec p7, NS3/NS4A et E1-E2, pour les recruter au site d'assemblage des virions (Stapleford et Lindenbach, 2011). De même, elle est impliquée dans le recrutement de la protéine Core des GL aux plateformes d'assemblage viral (Counihan *et al.*, 2011). Ainsi, NS2 créerait un lien entre les protéines structurales et les protéines non structurales.

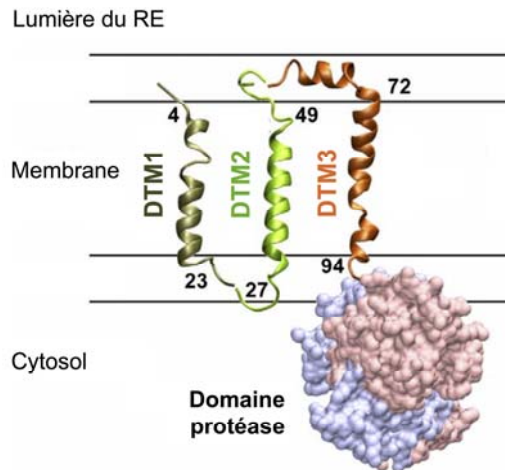


Figure 23. Structure de la protéine NS2. La protéine est composée de 3 DTM (1 à 3) et d'un domaine protéase. Les DTM sont représentés comme des entités séparées car les interactions entre les domaines ne sont pas connues. Le domaine protéase est composé de 2 sous-unités (rose et bleue) et est orienté vers le cytoplasme. Figure adaptée de Jirasko *et al.*, 2010

e) Le complexe NS3/NS4A

Le complexe NS3-NS4A est essentiel à la maturation de la polyprotéine virale et à la réplication du virus. Il est composé de NS3, possédant un domaine sérine protéase en Nter et un domaine NTPase/ARN hélicase en Cter, et de son cofacteur NS4A (Morikawa *et al.*, 2011). Sa structure a été résolue dès 1999 : NS3 est divisée en 2 sous-domaines, un en Cter et un en Nter, repliés en tonneau β et stabilisé par un ion Zn^{2+} (Figure 24) (Yao *et al.*, 1999). Le peptide NS4A agit comme un cofacteur de l'enzyme NS3 et permet d'ancrer le complexe à la membrane du RE, NS3 ne possédant pas de DTM (Brass *et al.*, 2008 ; Beran *et al.*, 2009). NS4A interagit également avec d'autres protéines virales et participe à la réplication de l'ARN viral et à l'assemblage des virions (Lindenbach *et al.*, 2007 ; Phan *et al.*, 2011). L'association aux membranes du RE est un déterminant important pour le repliement correct du site actif de la sérine protéase. Grâce à son activité protéase, NS3-NS4A clive la polyprotéine aux jonctions NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B et permet ainsi la maturation de la polyprotéine. Dans une moindre mesure, NS3-NS4A est également retrouvée au niveau des mitochondries et des membranes associées (Horner *et al.*, 2011). C'est à ce niveau que la protéase virale peut cliver le

facteur MAVS (voir chapitre « Réponse immunitaire innée anti-HCV ») (Meylan *et al.*, 2005).

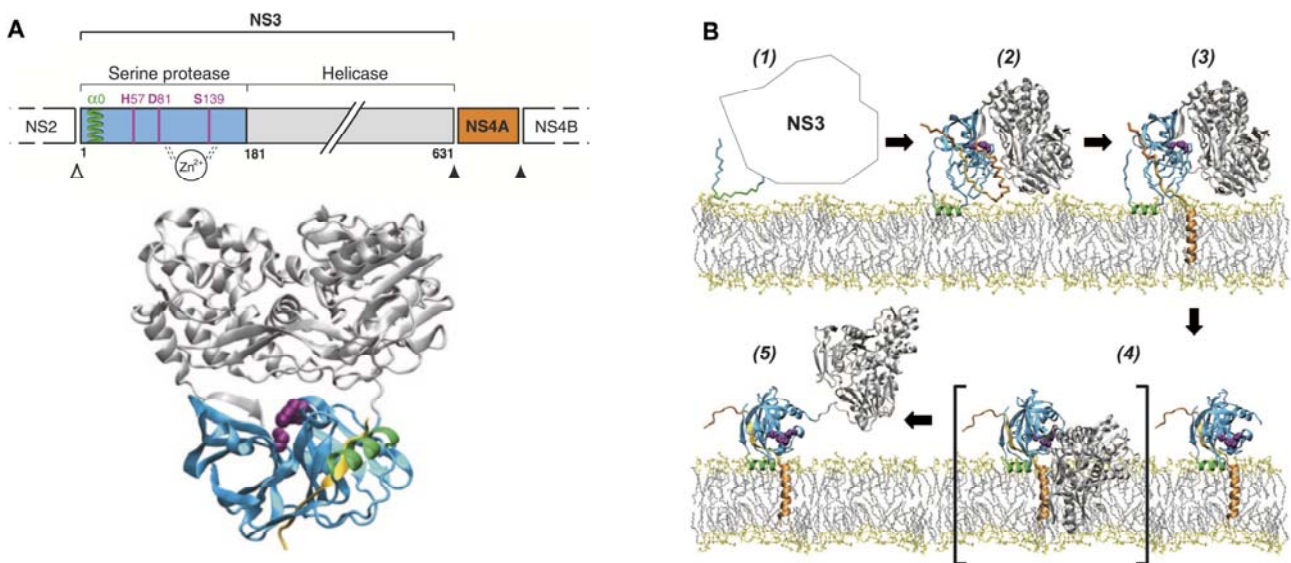


Figure 24. Structure 3D du complexe NS3-NS4A. (A) Représentation schématique de la région NS3-NS4A dans la polyprotéine du HCV. Les domaines sérine protéase et NTPase/ARN hélicase sont représentés en bleu et gris respectivement. Le site actif de la sérine protéase est représenté en rose. Un ion Zn^{2+} stabilise la structure. L'hélice α de la partie Nter est représentée en vert et NS4A en orange. Le triangle blanc correspond au clivage de la protéine par NS2, tandis que les triangles noirs correspondent aux clivages par la protéase NS3-NS4A (en *cis* et en *trans*). La structure 3D du complexe est illustrée selon le même code couleur. (B) Modèle d'association de NS3-NS4A à la membrane du RE. (1) La protéine est produite à la membrane du RE. (2) L'hélice α en Nter interagit directement avec la membrane et permet le repliement correct des domaines sérine protéase et NTPase/hélicase. (3) Le domaine hydrophobe en Nter de NS4A est inséré dans la membrane après clivage à la jonction NS3/NS4A. (4) L'association à la membrane verrouille le domaine protéase dans sa conformation finale. (5) Enfin, le domaine hélicase s'éloigne du domaine protéase grâce à une rotation de la région « linker » reliant les deux domaines. Figure adaptée de Morikawa *et al.*, 2011.

L'activité NTPase/ARN hélicase de NS3 joue quant-à-elle un rôle important dans la réplication de l'ARN viral. Grâce à l'hydrolyse de molécules d'ATP, elle ouvre les régions de l'ARN viral très structurées et les formes répliquatives ARNdb du virus (Morikawa *et al.*, 2011). Il a également été observé que des mutations spécifiques dans la séquence de NS3 augmentent la réplication de l'ARN viral tout en baissant la production de virus, suggérant que NS3 contribue au « switch » de la réplication vers l'assemblage (Pietschmann *et al.*, 2009). Comme décrit précédemment, l'interaction entre NS2 et NS3-NS4A est impliquée dans le recrutement de Core lors de l'assemblage viral (Counihan *et al.*, 2011). Etant donné que NS3-NS4A lie l'ARN viral, une hypothèse intéressante serait que ce complexe permette l'empaquetage de l'ARN dans la capsid pendant l'assemblage (Jones *et al.*, 2011).

f) NS4B : rendez-vous en terre inconnue

NS4B est une protéine hydrophobe de 261 aa, intégralement membranaire. Cette protéine est relativement peu caractérisée et son rôle est resté inconnu pendant de nombreuses années (pour revue, voir Sklan et Glenn, 2006 ; Gouttenoire *et al.*, 2010a). D'un point de vue structural, cette protéine comprend un domaine en Nter, une partie centrale divisée en 4 DTM, et un domaine en Cter (**Figure 25**). Le domaine Nter, divisé en deux hélices α amphipathiques (AH1 et AH2), joue un rôle important dans la formation du complexe de réplication fonctionnel en interagissant avec d'autres protéines virales. Le domaine Cter comprend une hélice α hautement conservée (H1) et une seconde hélice amphipathique associée à la membrane (H2). Leur rôle reste encore méconnu (Gouttenoire *et al.*, 2010a).

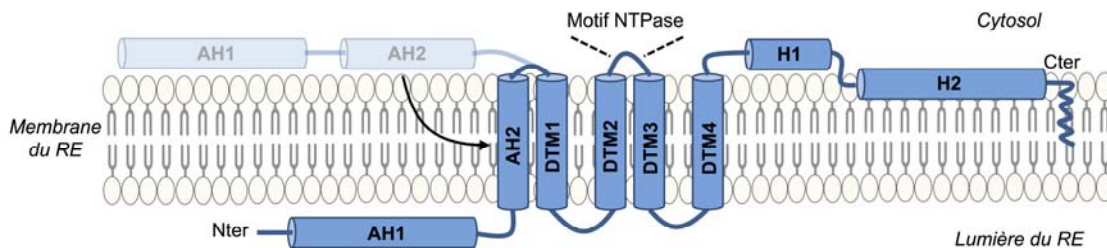


Figure 25. Structure schématique de la protéine NS4B. Le schéma ci-dessus représente la protéine NS4B ancrée dans la membrane du RE. La protéine est formée de 2 hélices amphipathiques en Nter (AH1 et AH2), 4 DTM (DTM1-DTM4) et 2 hélices α en Cter (H1 et H2). La partie Nter peut transloquer dans la membrane du RE grâce à l'interaction de AH2 avec DTM1, créant ainsi un 5^e DTM. Un domaine NTPase a été décrit dans une boucle cytosolique. Son rôle est inconnu. Figure inspirée de Gouttenoire *et al.*, 2010a.

Au cours de l'infection par le HCV, NS4B est responsable de la prolifération de membranes altérées, dérivées du RE, regroupées sous le nom de *membranous web* (voir chapitre « Réplication virale »). Ces membranes aberrantes sont courbées et forment des vésicules constituant le siège de la réplication virale (Egger *et al.*, 2002 ; Gosert *et al.*, 2003). La structure intégralement membranaire de NS4B et son oligomérisation permettrait cette courbure des membranes du RE et la formation des vésicules (Gouttenoire *et al.*, 2010b ; Paul *et al.*, 2011). Néanmoins, le mécanisme exact menant à la formation du *membranous web* par NS4B reste encore inconnu. Enfin, NS4B peut se lier à l'ARN viral et semble posséder une activité NTPase dont le rôle est là encore inconnu (Einav *et al.*, 2004 ; Thompson *et al.*, 2009).

g) NS5A : une protéine « couteau-suisse »

NS5A est une phosphoprotéine de 447 aa ne possédant pas d'activité enzymatique, mais jouant un rôle-clé dans la régulation de la réplication et de l'assemblage viral, ainsi que dans le passage d'une étape à l'autre en interagissant avec de nombreuses protéines (Moradpour et Penin, 2013). Structurellement, cette protéine possède une hélice α amphipathique en Nter (H1) suivie de 3 domaines DI, DII et DIII, eux-mêmes séparés par des séquences peu complexes nommées LCS (*low complexity sequences*) (**Figure 26**) (Tellinghuisen *et al.*, 2005). NS5A est ancrée à la membrane du RE par sa partie Nter, grâce à H1. Cette propriété lui permet également de s'ancrer aux GL présentes au niveau du RE (Penin *et al.*, 2004). La structure 3D de la partie Nter de NS5A montre que DI se dimérise et adopte un repliement en forme de « serre », exposant ses griffes vers le cytoplasme. Chaque monomère est stabilisé par un atome de zinc (**Figure 26**). Cette structure lui permet d'interagir avec l'ARN viral (Tellinghuisen *et al.*, 2005 ; Hwang *et al.*, 2010). Une autre étude a montré que ce dimère pouvait exister sous 2 conformations différentes. Le « *switch* » entre ces deux formes peut être responsable du passage de l'étape de réplication à l'étape l'assemblage (Love *et al.*, 2009).

Les domaines DII et DIII sont peu structurés (**Figure 26**). Ils interagissent avec plusieurs facteurs de l'hôte indispensables au virus comme la phosphatidylinositol 4-kinase III α (PI4KIII α). Cette dernière est activée par NS5A afin de produire du phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) dans les membranes du RE, élément indispensable à la formation du complexe de réplication (Reiss *et al.* 2011). NS5A interagit également avec la cyclophiline A (CypA) qui est un facteur essentiel à la fois à la replication et à l'assemblage du virus (Kaul *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2009). Enfin, NS5A interagit avec apoE lors de l'assemblage des particules virales (Benga *et al.*, 2010).

Il est à noter que les domaines de NS5A interviennent dans des étapes différentes du cycle viral. DI et DII sont principalement impliqués dans la réplication de l'ARN viral alors que DIII est nécessaire à l'assemblage des virions en interagissant avec la protéine Core (Appel *et al.*, 2008 ; Tellinghuisen *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2011).

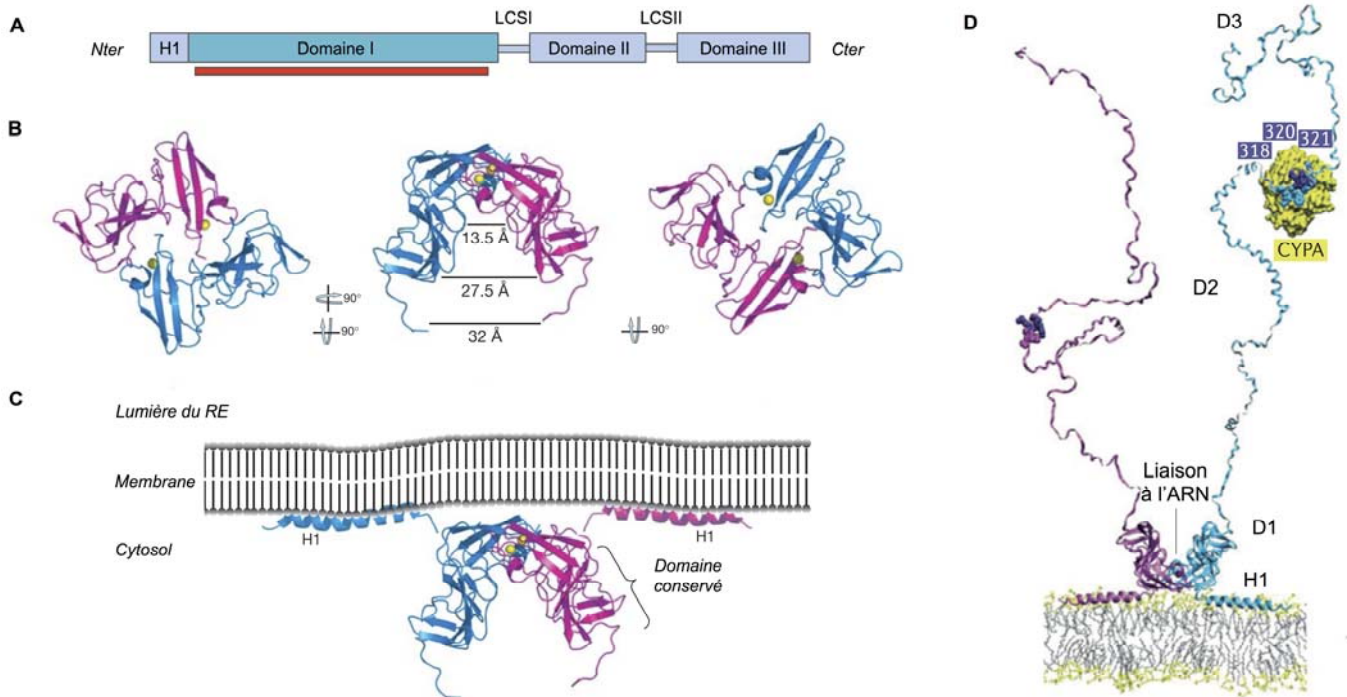


Figure 26. Structure de la protéine NS5A. (A) Représentation schématique de la protéine NS5A illustrant la présence de l'hélice amphipathique H1 et des 3 domaines DI, DII et DIII séparés par les régions LCS. La partie surlignée en rouge correspond à la partie cristallisée. (B) Structure 3D d'un dimère du DI. Chaque dimère (rose et bleu) est stabilisé par un atome de zinc (rond jaune). (C) Conformation d'un dimère du DI à la membrane du RE. Figure adaptée de Tellinghuisen *et al.*, 2005 (D) Structure 3D de la protéine NS5A. Cette structure montre que les domaines DII et DIII sont peu structurés pour interagir avec de nombreux ligands. Sur cette image figure en exemple le site de liaison à la CypA. Figure adaptée de Bartenschlager *et al.*, 2013.

NS5A peut être retrouvée sous deux formes : une forme phosphorylée à niveau basal (56kDa) et une forme hyperphosphorylée (58kDa). Plusieurs kinases cellulaires peuvent phosphoryler NS5A dont la caséine kinase II α (CKII α) phosphorylant les résidus sérine sur le domaine DIII. Ces kinases sont donc indispensables au cycle viral du HCV (Quintavalle *et al.*, 2007 ; Tellinghuisen *et al.*, 2008). L'état de phosphorylation de NS5A impacte directement la répllication du virus. Alors que la forme peu phosphorylée promeut la répllication virale, la forme hyperphosphorylée va au contraire réduire son efficacité (Neddermann *et al.*, 2004). De plus, tout comme NS3, les mutations de NS5A qui améliorent la répllication diminuent l'assemblage des particules virales (Pietschmann *et al.*, 2009). Enfin, il a été démontré que la phosphorylation de NS5A par la CKII α est essentielle à l'assemblage des particules virales (Tellinghuisen *et al.*, 2008). La régulation de la phosphorylation de NS5A permet donc de passer de l'étape de répllication virale à l'assemblage des particules infectieuses, comme un interrupteur moléculaire.

h) La polymérase virale NS5B

NS5B est l'ARN polymérase ARN dépendante virale (RdRp pour *RNA dependent RNA polymerase*). Elle utilise l'ARN viral génomique de polarité positive comme matrice pour synthétiser un brin d'ARN négatif complémentaire, afin de répliquer ensuite le génome viral. La particularité de cette enzyme est qu'elle peut initier la synthèse du brin négatif *de novo*, sans amorce, avec uniquement la présence d'ions magnésium ou manganèse comme cofacteurs. Comme toutes les polymérases de la même famille, le domaine catalytique de NS5B est organisé à l'image d'une main droite, avec des domaines correspondant à la paume, au pouce et aux doigts (**Figure 27**). Le très conservé motif GDD est également retrouvé dans le domaine actif de l'enzyme.

Lors de la réplication, la matrice ARN se place dans une poche située entre les doigts et le pouce et est acheminée directement au site actif de l'enzyme dans la paume. Les NTP accède au site actif par une sorte de tunnel allant de la périphérie à la paume (Lesburg *et al.*, 2000 ; Simister *et al.*, 2009 ; Moradpour et Penin, 2013). Pour initier la synthèse du brin négatif *de novo*, la polymérase adopte une conformation fermée (**Figure 27**). Un élément « *linker* » de 40 aa situé dans la partie Cter vient obstruer le site actif en interagissant avec un domaine de la paume structuré en épingle, nommé « *β flap element* ». Cet élément *linker* permet la liaison du premier dinucléotide. L'élongation est ensuite déclenchée par un changement de conformation vers une forme ouverte qui permet de démasquer le site actif (Harrus *et al.*, 2010 ; Mosley *et al.*, 2012). NS5B ne possède pas d'activité correctrice ou *proofreading*. Elle insère ainsi une erreur dans l'ARN viral environ tous les 1000 nucléotides. La polymérase virale est donc majoritairement responsable de la grande variabilité génétique du HCV, et de la génération des quasi-espèces chez les patients infectés (Di Lorenzo *et al.*, 2011).

NS5B est ancrée à la membrane du RE grâce à un domaine de 21 aa situé en Cter. Cet ancrage est indispensable à la réplication de l'ARN viral dans les cellules (Moradpour *et al.*, 2004). Le site catalytique est ainsi intégré dans la membrane et orienté vers le cytoplasme (Schmidt-Mende *et al.*, 2001). Le changement de conformation du *linker* en Cter, relié au domaine d'ancrage à la membrane, permet de démasquer le site catalytique et de le « pousser » vers le cytoplasme afin de favoriser la liaison à l'ARN (**Figure 27**) (Bartenschlager *et al.*, 2013).

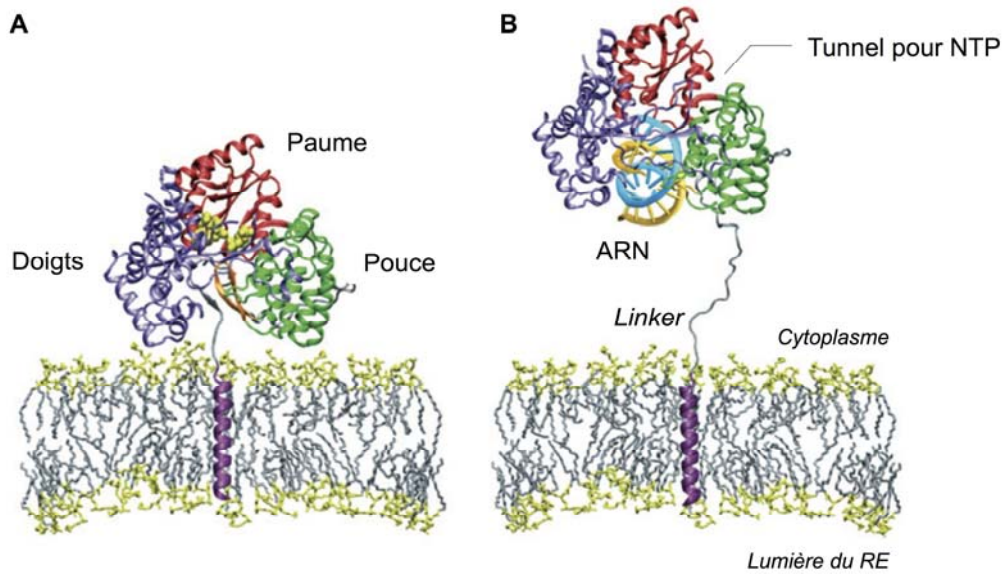


Figure 27. Structure de la polymérase virale NS5B. Les domaines doigts (violet), paume (rouge) et pouce (vert) ainsi que la boucle β ou β flap (orange) de la polymérase virale sont indiqués sur la structure 3D. L'élément *linker* en Cter (gris) est connecté au domaine d'ancrage au RE (magenta). En (A), la polymérase est représentée sous sa conformation fermée adoptée lors de l'initiation de la réplication. Le site actif est mis en évidence par les premiers nucléotides insérés représentés en jaune. En (B), la conformation ouverte de la polymérase est représentée par un modèle hypothétique proposant que l'élongation de l'ARN soit déclenchée par un changement de conformation de l'enzyme induit par l'élongation du *linker*. Un ARNdb (intermédiaire de réplication) est représenté dans le site actif. Figure adaptée de Bartenschlager *et al.*, 2013.

VII. Les modèles d'étude du virus : du chimpanzé aux HCVcc

Depuis la découverte du HCV en 1989, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension du cycle viral, des relations virus-hôte, de la pathogenèse ou encore dans le développement de nouvelles thérapies efficaces. Ces découvertes ont été permises grâce à l'amélioration des modèles d'étude du virus à la fois chez l'animal et en culture cellulaire. Ce chapitre résume les modèles d'étude du HCV qui existent aujourd'hui.

1. Modèles animaux

a) Le chimpanzé : modèle historique

Le chimpanzé a été le premier modèle d'étude du HCV. Avec plus de 98% d'identité génétique partagée avec l'Homme, le chimpanzé reste notre plus proche cousin. Hormis l'Homme, il s'agit de la seule espèce susceptible à l'infection par le HCV. Les chimpanzés ont joué un rôle crucial dans la découverte des hépatites NANB. Les premières infections

ayant été réalisées chez l'animal dès 1978, grâce à l'injection de sérums de patients infectés (Alter *et al.*, 1978). Ce modèle a donc permis d'étudier l'évolution de la maladie et a contribué à l'identification du HCV, 10 ans plus tard (Choo *et al.*, 1989). Un des avantages de ce modèle d'étude repose sur la cinétique d'infection par le virus qui est très similaire à celle observée



L'exception confirmant la règle

Le chimpanzé est le seul animal susceptible à l'infection par HCV... En réalité, il existe un autre animal susceptible à l'infection par le virus, capable de développer des stéatoses et des cirrhoses hépatiques associées au HCV. Il s'agit de la musaraigne des arbres ou Tupaia, un petit mammifère vivant en Asie du Sud Est et proche des primates. Cet animal peut également être infecté par d'autres virus humains comme HBV l'*herpes simplex virus* et les Rotavirus (Zhao *et al.*, 2002 ; Amako *et al.*, 2010).

chez l'Homme. En effet, la phase aiguë de la maladie, bien que moins marquée chez le chimpanzé, est caractérisée par l'apparition d'une forte virémie, une forte réponse immunitaire innée et adaptative et une augmentation soudaine des taux d'ALAT. De plus, la maladie évolue fréquemment vers la chronicité, associée à une virémie persistante et un échappement du virus au système immunitaire. Cependant, les chimpanzés ne développent que très rarement des complications telles que la cirrhose hépatique et le CHC (pour revue, voir Billerbeck *et al.*, 2013). De nombreuses molécules anti-HCV ont été testées chez le chimpanzé, ainsi que de nouvelles stratégies vaccinales (Folgori *et al.*, 2006). L'efficacité des traitements sans IFN grâce aux nouveaux DAA ou aux HTA a notamment été démontrée chez cet animal (Landford *et al.*, 2010 ; Olsen *et al.*, 2011). De nos jours, le chimpanzé demeure encore le meilleur modèle d'étude *in vivo*. Cependant, bien qu'il ait permis de nombreuses avancées, les contraintes éthiques et les hauts coûts qui lui sont associés rendent ce modèle globalement peu accessible et interdit dans de nombreux pays (Billerbeck *et al.*, 2013). En effet, l'utilisation de chimpanzés pour la recherche biomédicale est maintenant interdite en Europe par la nouvelle directive Européenne 2010/63 (Harrington, 2012).

b) Les modèles murins

HCV possédant une spécificité d'espèce très restreinte, le développement d'un modèle animal s'est avéré difficile. Les souris sont les modèles animaux de laboratoire par excellence. Cependant, elles ne sont pas des hôtes naturels du HCV et les hépatocytes murins ne permettent pas l'entrée et la réplication du virus (Ploss *et al.*, 2009 ; Dorner *et al.*, 2011). A l'opposé, les étapes d'assemblage et d'export du HCV peuvent avoir lieu dans les cellules murines (Long *et al.*, 2011 ; Vogt *et al.*, 2013).

Grâce à l'avancée des technologies permettant d'obtenir des animaux transgéniques, différents modèles murins ont été créés pour étudier le cycle viral du HCV. Les premières souris transgéniques créées sur-exprimaient les protéines virales du HCV. Ces souris présentaient des pathologies hépatiques comme la stéatose et le CHC. Cependant, la surexpression des protéines virales dans un contexte où le virus n'est pas répliqué n'est pas représentative d'une infection normale par HCV. De plus, le système immunitaire murin tolère les protéines virales surexprimées et ne reproduit pas l'environnement inflammatoire dans le foie, comme observé chez l'Homme (Billerbeck *et al.*, 2013). D'autres modèles murins ont donc été développés pour étudier le cycle viral, en suivant 2 grandes stratégies : les souris xéno greffées avec des cellules humaines et les souris transgéniques (**Figure 28**) (pour revue, voir Mailly *et al.*, 2013 ; Vercauteren *et al.*, 2015).

Les souris xéno greffées

Une grande avancée dans les modèles d'études murins du HCV a été la génération de souris xéno greffées avec des hépatocytes humains. Les xéno greffes sont réalisées chez des souris immunodéficientes pour éviter le rejet de greffe. Ces souris présentent également une hépatodéficienc e créant une niche pour les hépatocytes humains (Mercer *et al.*, 2001 ; Bissig *et al.*, 2010). Les hépatocytes primaires humains (ou PHH *pour primary human hepatocytes*) sont injectées aux souris par voie intrasplénique. Ils vont ensuite migrer dans le foie et vont repeupler l'organe grâce à leurs remarquables capacités de régénération. (Tateno *et al.*, 2004 ; Meuleman *et al.*, 2005 ; Fausto *et al.*, 2006). Deux modèles murins sont majoritairement utilisés pour générer des souris chimériques : les souris uPA-SCID et les souris FRG (Vercauteren *et al.*, 2015).

Les souris uPA-SCID sont les premières à avoir été décrites. Elles sont issues du croisement entre des souris immunodéficientes SCID (*severe combined immunodeficiency*), ne possédant ni LT, ni LB et des souris exprimant le transgène uPA (*urokinase-type plasminogen activator transgene*) au niveau du foie. Le gène uPA est sous contrôle du promoteur de l'albumine, ce qui permet une forte expression du transgène spécifiquement au niveau du foie et entraîne une dégénérescence des hépatocytes murins (Mercer *et al.*, 2001). Pour obtenir une infection par HCV, les foies murins doivent être repeuplés à 30% au minimum par des PHH fonctionnels. La xéno greffe est considérée comme réussie si le taux d'albumine humaine sérique, produite par les PHH, est de 1 mg/mL (Vanwolleghem *et al.*, 2010). Après infection par HCV, des titres viraux de 10^7 UI/ mL ont pu être observés, jusqu'à 10 mois après infection (Mercer *et al.*, 2001 ; Hiraga *et al.*, 2007 ; Vanwolleghem

et al., 2010). De plus, les infections peuvent être réalisées à la fois avec des sérums de patients infectés par différents génotypes et avec des particules virales produites en culture cellulaire (Mercer *et al.*, 2001 ; Hsu *et al.*, 2003, Lindenbach *et al.*, 2006 ; Akazawa *et al.*, 2013). Ce modèle s'est révélé très utile dans de nombreuses études des facteurs d'entrée viraux et dans l'utilisation des nAbs pour inhiber l'entrée virale. De plus, il a récemment été utilisé pour tester l'efficacité de nouveaux DAA (pour revue, voir Mailly *et al.*, 2013). Cependant, l'utilisation des souris uPA-SCID est limitée par la fragilité des animaux greffés. En effet, ces souris sont greffées seulement quelques semaines après leur naissance car elles présentent un phénotype hépatique létal (Vanwolleghem *et al.*, 2010). D'autres modèles murins ont donc été développés pour éviter ce problème, comme les souris FRG.

Les souris FRG sont issues d'un croisement entre les souris immunodéficientes RAG2^{-/-} IL-2R γ ^{-/-} et les souris FAH^{-/-} (*fumaryl acetoacetate hydrolase*) (Bissig *et al.*, 2010). Il s'agit de souris déficientes pour la FAH, une enzyme du catabolisme de la tyrosine. Le déficit en FAH entraîne l'accumulation de fumarylacétate hépatotoxique, entraînant la dégénérescence du foie et la mort des souris. La mort des souris peut être évitée grâce à l'administration de NTBC, une drogue qui compense la perte d'activité de la FAH et empêche la dégénérescence des hépatocytes (Grompe *et al.*, 1995). Ainsi, les souris FRG maintenues sous NTBC demeurent viables et en bonne santé avant la xéno greffe. Ce modèle a permis des greffes très efficaces chez les souris adultes, avec des repopulations par les PHH jusqu'à 95%, rendant ces souris très susceptibles au HCV (Bissig *et al.*, 2010).

Ces deux modèles permettent de fortes et reproductibles infections par HCV et ont été très utiles pour comprendre différents aspects du cycle viral (Billerbeck *et al.*, 2013). Cependant, pour éviter le rejet de greffe, elles sont immunodéficientes. Or, l'étude de la pathogenèse et de l'efficacité des vaccins candidats nécessite un système immunitaire fonctionnel. Le développement d'un modèle immunocompétent demeure donc une vraie nécessité (Vercauteren *et al.*, 2015). Une stratégie d'ores et déjà envisagée serait de co-transplanter des PHH et des cellules souches hématopoïétiques d'un même donneur afin d'obtenir des souris chimériques avec des PHH et un système immunitaire humain (Washburn *et al.*, 2011 ; Wilson *et al.*, 2014 ; Strick-Marchand *et al.*, 2015). Ce système permettrait d'étudier les relations entre le système immunitaire et HCV et les mécanismes menant à l'éradication du virus ou au contraire à l'échappement du virus au système immunitaire pour développer de nouvelles stratégies vaccinales.

Les souris génétiquement humanisées

Une autre stratégie pour développer des modèles murins immunocompétents susceptibles au HCV consiste à manipuler génétiquement les souris pour exprimer les facteurs humains essentiels à l'infection virale sur les hépatocytes murins. En 2009, il a été démontré que l'entrée du virus dans les hépatocytes murins nécessitait la présence d'au minimum deux facteurs humains : le CD81 et l'OCLN (Ploss *et al.*, 2009). En 2011, CD81 et OCLN humains ont été exprimés de manière transitoire dans le foie de souris grâce à des vecteurs adénoviraux. Cette étude a démontré avec succès que ces deux facteurs permettaient l'entrée du HCV dans les hépatocytes murins *in vivo* (Dorner *et al.*, 2011). Ces résultats encourageants ont permis le développement de souris transgéniques exprimant 4 facteurs d'entrée humains, CD81, SR-BI, CLDN1 et OCLN. Ces souris peuvent non seulement être infectées par le virus, mais sont également capables de répliquer et de produire le virus à de faible taux (Dorner *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2014). L'obtention d'une forte répllication du virus chez la souris est maintenant la prochaine étape essentielle pour obtenir un cycle viral complet, puisque les hépatocytes de souris permettent l'assemblage et l'export des particules virales (Long *et al.*, 2011). Il a été démontré que les systèmes réplicons peuvent se répliquer dans les cellules murines, indiquant qu'il n'y a pas de facteurs restrictifs pour la répllication du HCV (Zhu *et al.*, 2003 ; Uprichard *et al.*, 2006 ; Frentzen *et al.*, 2011). La faible répllication du HCV peut s'expliquer par une forte réponse immunitaire innée dans les hépatocytes murins (Dorner *et al.*, 2013 ; Shoggins et Rice, 2013 ; Chen *et al.*, 2014).

L'adaptation virale

Une possibilité envisagée pour infecter des hépatocytes murins sans manipulations génétiques est d'adapter HCV aux cellules de souris en culture cellulaire, en tirant partie de l'infidélité de l'ARN polymérase virale. Dans une étude publiée en 2010, les auteurs ont exprimé le CD81 murins dans des cellules Huh7-Lunet, dérivée d'hépatocarcinome humain et exprimant très peu le CD81 humain. Après plusieurs passages des cellules, les virions produits se sont adaptés au CD81 murins et ont donc acquis la capacité d'entrer dans des hépatocytes murins (Bitzegeo *et al.*, 2010). Ce système est très prometteur mais est cependant limité. Les mutations adaptatives dans les glycoprotéines E1 et E2 empêchent l'étude de l'échappement du virus aux nABs et le développement de nouveaux outils thérapeutiques pour inhiber l'entrée du virus (Bitzegeo *et al.*, 2010 ; Mailly *et al.*, 2013). De plus, les virus mutants ne se répliquent pas dans les cellules murines

probablement à cause d'une forte réponse innée. En effet, une étude a reporté que les virus adaptés aux cellules murines pouvaient engager un cycle viral complet uniquement dans des cellules hépatiques de souris immortalisées ayant une immunité innée fortement réduite (Frentzen *et al.*, 2014). Ces études démontrent que la barrière de l'espèce peut être franchie grâce à quelques mutations adaptatives et offrent des perspectives prometteuses pour le développement futur des modèles animaux.

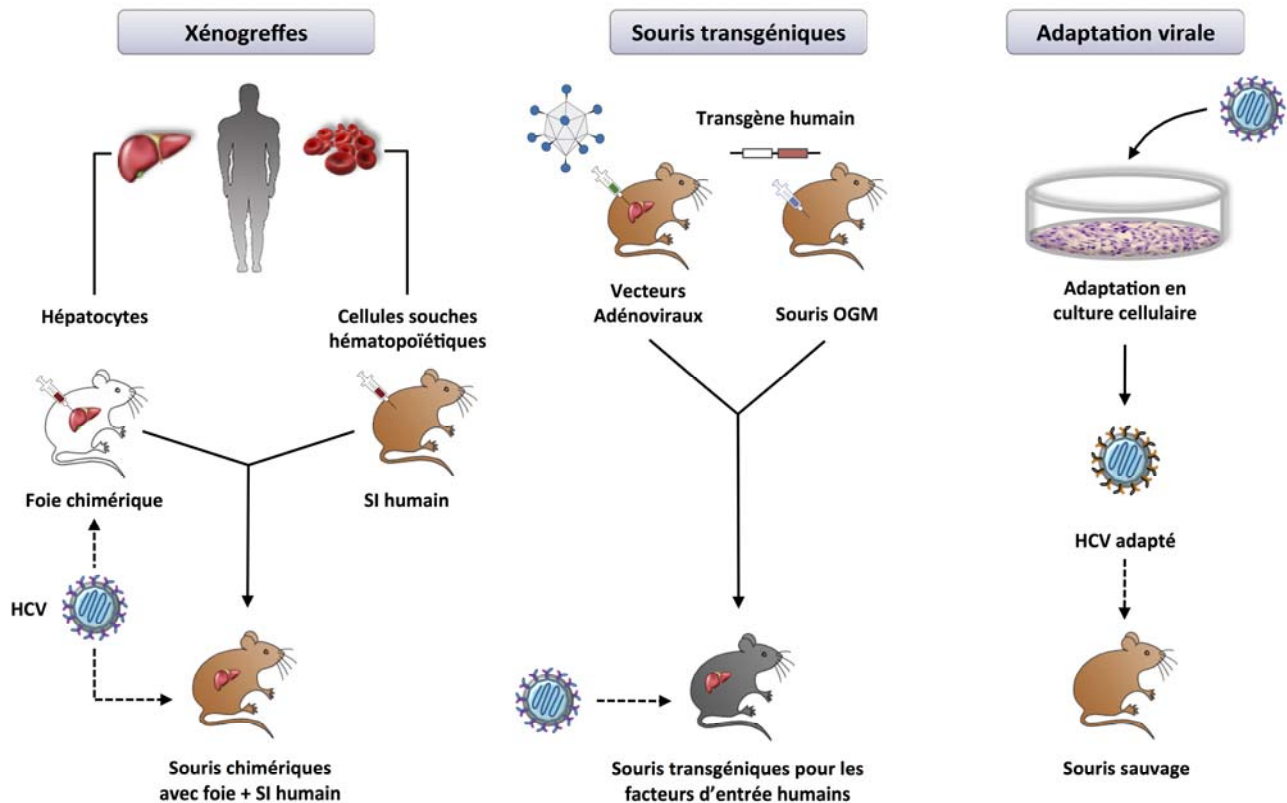



Figure 28. Trois grandes stratégies pour obtenir des souris susceptibles au HCV. La première stratégie consiste à réaliser des xéno greffes de PHH chez des souris immunodéficientes pour obtenir des souris avec un foie chimérique. Les souris peuvent également être greffées à la fois par des cellules souches hématopoïétiques humaines et par des PHH pour obtenir des souris chimériques susceptibles à l'infection par HCV et immunocompétentes avec un système immunitaire (SI) humain. La seconde stratégie permet d'obtenir des souris transgéniques exprimant les facteurs d'entrée viraux humains, soit par injection transitoire d'Adénovirus exprimant un transgène, soit par génération de souris génétiquement modifiées. Enfin, une autre stratégie envisageable est l'adaptation du virus en culture cellulaire (cellules humaines exprimant des facteurs d'entrée murins) pour obtenir des virus pouvant entrer dans les hépatocytes de souris non modifiées génétiquement. Figure adaptée de Mailly *et al.*, 2013 et Vercauteren *et al.*, 2015.

2. Modèles cellulaires

a) Le modèle réplicon

Après la découverte du HCV en 1989, de nombreuses expériences ont été réalisées pour tenter d'infecter des lignées cellulaires *in vitro* mais n'ont pas permis l'obtention d'une forte répllication virale pour étudier le cycle viral. Ce n'est qu'en



Les cellules Huh7

Les cellules Huh-7 ont été cultivées la première fois en 1982. Il s'agit d'hépatocytes différenciés issus d'une tumeur du foie d'un homme japonais de 57 ans. Ces cellules sont capables de produire la majorité des protéines hépatiques tout comme les hépatocytes sains (Nakabayshi *et al.*, 1982).

1999 que Lohmann et ses collaborateurs ont permis une avancée importante dans l'étude du HCV *in vitro* en mettant au point le système du réplicon subgénomique (Steinmann et Pietschmann, 2013). Le réplicon subgénomique correspond à un ARN viral délété des régions codant les protéines structurales (Core, E1, E2) et les protéines p7 et NS2 (**Figure 29**). Il ne permet donc pas la production de particules virales infectieuses et est utilisé uniquement pour étudier la répllication virale. La délétion de ces régions a permis l'insertion d'un gène de résistance à la néomycine (*neo*) sans excéder la taille du génome sauvage. Le premier prototype à avoir été créé est un ARN bicistronique codant le gène *neo* traduit sous contrôle de l'IRES du HCV, suivi de l'IRES de l'EMCV contrôlant l'expression des gènes NS3 à NS5B du HCV génotype 1b (Con1). Cet ARN est transfecté dans les cellules Huh7 (*human hepatoma cells*) dérivées d'hépatocarcinome humain (**voir encadré**) cultivées en présence de G418 pour ne sélectionner que les cellules contenant le réplicon (Lohmann *et al.*, 1999). Ce système a été très utilisé par la suite et au vu de son succès, de nombreuses autres constructions ont vu le jour pour étudier la répllication d'autres génotypes viraux (Bartenschlager *et al.*, 2006). De plus, des systèmes de réplicon génomiques ont également été mis au point. Ces derniers expriment la totalité des protéines virales et répliquent fortement le virus *in vitro*, mais ne permettent cependant pas la production de particules virales (Pietschmann *et al.*, 2002).

A long terme, des mutations sont apparues dans l'ARN réplicon, permettant de meilleurs taux de répllication en culture cellulaire. Cette adaptation correspond à l'apparition des REM ou *replication enhancing mutations*, dues à l'infidélité de la polymérase virale. De plus, la pression de sélection a également induit une évolution des cellules Huh7 vers des cellules plus permissives au réplicon. Cette découverte a permis d'obtenir les cellules Huh7.5 et Huh7.5.1, très utilisées de nos jours (Blight *et al.*, 2002 ; Zhong *et al.*, 2005 ; Zhong *et al.*, 2006). Ces cellules sont très permissives au virus car

elles possèdent une mutation du gène RIG-I, inhibant la reconnaissance du virus par les défenses de l'hôte et la production d'IFN (Sumpter *et al.*, 2005).

b) Les pseudo-particules rétrovirales ou HCVpp

Le modèle réplicon restreignant l'étude du cycle viral à la réplication, un modèle innovant a été mis au point en 2003 pour l'étude de l'entrée virale en culture cellulaire. Ce modèle est basé sur la production de pseudo-particules rétrovirales exprimant les glycoprotéines E1 et E2 à leur surface : les HCVpp (Bartosch *et al.*, 2003 ; Hsu *et al.*, 2003). La production de ces HCVpp nécessite la co-transfection de cellules 293T avec 3 plasmides codant respectivement les glycoprotéines E1 et E2 du HCV, les protéines gag-pol du HIV ou du *murine leukemia virus* (MLV) et un génome rétroviral codant un gène rapporteur comme la luciférase (**Figure 29**). L'entrée des particules dans les cellules, dépendante de E1 et E2, mène à la libération de la capsid rétrovirale dans le cytoplasme puis à l'intégration du génome rétroviral dans la cellule hôte après une étape de reverse-transcription. Le gène rapporteur est ainsi rapidement exprimé, témoignant de l'entrée des HCVpp. Les HCVpp ont permis de confirmer le rôle primordial de CD81 et de SR-BI dans l'entrée virale et ont permis d'identifier d'autres facteurs d'entrée comme CLDN1 et OCLN (pour revue, voir Zeisel *et al.*, 2013). Néanmoins, ce système présente des limites. Les particules étant produites en cellules 293T, elles ne permettent pas de reproduire les interactions entre les protéines E1-E2 et les composants des lipoprotéines. De même, les étapes tardives du cycle viral ne peuvent pas être étudiées avec ce modèle (Steinmann et Pietschmann, 2013).

c) Le modèle HCV en culture cellulaire ou HCVcc

En 2001, Kato et ses collègues ont publié la construction d'un réplicon subgénomique JFH1. Il s'agit d'un clone, isolé chez un patient japonais infecté par le génotype 2a d'HCV, ayant développé une hépatite fulminante (Kato *et al.*, 2001). Ce réplicon avait la capacité de se répliquer fortement en culture cellulaire sans adaptations nécessaires (Kato *et al.*, 2003). L'étude de ce clone a constitué les préludes d'une découverte majeure dans l'histoire de la recherche sur HCV. En effet, 4 ans plus tard, Wakita *et al.*, ont reporté que le génome entier du clone JFH1 permettait d'obtenir la production de particules virales infectieuses dans les cellules Huh7 (**Figure 29**) (Wakita *et al.*, 2005). La même année, deux autres groupes ont reporté que des génomes chimères possédant les régions codant

NS3-NS5B du JFH1 et les régions codant Core-NS2 d'autres souches virales permettaient eux aussi d'obtenir un cycle viral complet en culture cellulaire. De plus, les particules produites *in vitro* étaient également infectieuses *in vivo* (Lindenbach *et al.*, 2005 ; Zhong *et al.*, 2005). Ce modèle d'étude a été nommé HCVcc pour *cell culture-derived HCV* et a permis l'étude du cycle viral dans son intégralité.

Depuis, plusieurs chimères intragénotypiques ont été générées, permettant des taux de réplication plus élevés que le JFH1. Il s'agit, par exemple, de la chimère J6/JFH1 (génotype 2a) couramment appelé Jc1 (Lindenbach *et al.*, 2005; Pietschmann *et al.*, 2006). Pour faciliter l'étude du cycle viral, des gènes rapporteurs tels que la luciférase ont été insérés dans les génomes viraux. Par exemple, le clone Luc-Jc1 contient le gène de la luciférase sous contrôle de l'IRES du HCV, suivi de la séquence codant les protéines virales de la chimère Jc1 sous contrôle de l'IRES de l'EMCV (**Figure 29**) (Koutsoudakis *et al.*, 2006). Cependant, la génération d'un modèle HCVcc solide pour étudier le cycle de génotypes viraux différents du génotype 2a demeure un vrai challenge de nos jours (Steinmann et Pietschmann, 2013).

d) Un modèle alternatif : les HCV_{TCP}

Les réplicons subgénomiques contiennent tous les éléments nécessaires à la réplication virale dans les cellules Huh7 mais ne peuvent pas produire de particules virales infectieuses. Ce déficit peut être restauré en exprimant en *trans* les protéines structurales Core, E1, E2, et non structurales NS2 et p7 du HCV grâce à un virus *helper* produit dans des cellules 293T (Ishii *et al.*, 2008 ; Steinmann *et al.*, 2008 ; Adair *et al.*, 2009). Les particules générées sont nommées HCV_{TCP} pour HCV *trans-complemented particles*. Ce modèle permet l'étude des étapes précoces et tardives du cycle viral indépendamment. De plus, l'absence de dissémination du HCV en absence de virus *helper* rend ce modèle d'étude plus sûr que les HCVcc (Steinmann *et al.*, 2008).

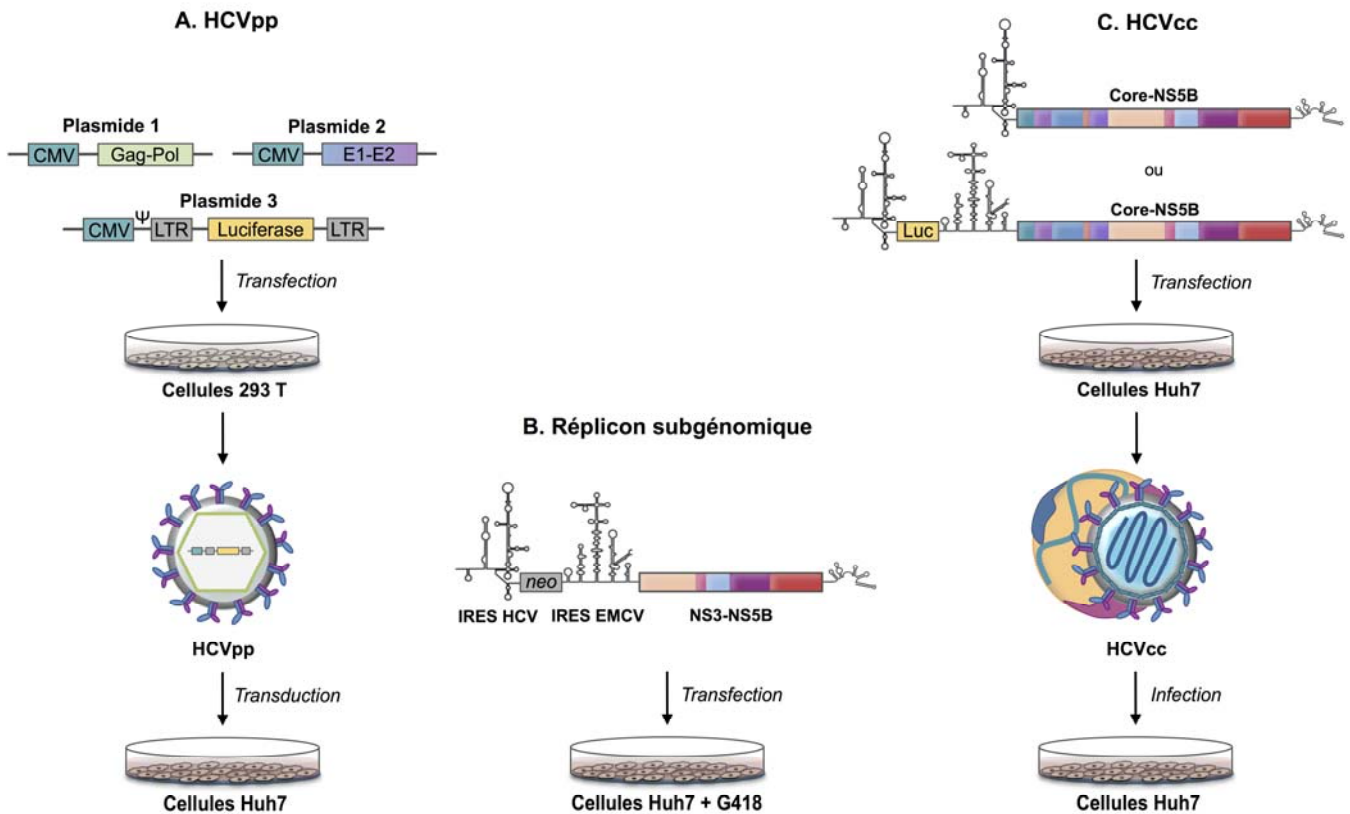


Figure 29. Trois modèles principaux pour l'étude du cycle viral du HCV en culture cellulaire. (A) Les HCVpp sont des particules lentivirales produites en cellules 293T, exprimant E1 E2 à leur surface. Ils permettent l'étude de l'entrée virale dans les cellules hépatocytaires. (B) Le réplicon subgénomique code un gène de résistance à la néomycine sous contrôle de l'IRES HCV et la région codant NS3-NS5B du génome viral sous contrôle de l'IRES EMCV. Il permet l'étude de la réplication virale après transfection de l'ARN produit *in vitro* dans des cellules Huh7 ou des cellules dérivées. (C) Enfin les HCVcc correspondent aux particules virales produites à partir de l'ARN génomique complet du HCV (JFH1 ou chimères) ou portant un gène rapporteur supplémentaire. Ils permettent l'étude du cycle viral dans son intégralité.

e) Vers un modèle plus proche de la physiologie

Les cellules Huh7 et leurs dérivés constituent un très bon modèle d'étude pour le cycle du HCV. Ce modèle s'avère toutefois limité par l'absence de polarisation des Huh7 et une différence dans l'expression de certains facteurs d'hôte par rapport à des hépatocytes sains (Decaens *et al.*, 2008). De manière intéressante, l'ajout de dimethyl sulfoxyde (DMSO) dans le milieu de culture des Huh7 permet d'obtenir un phénotype « *hepatocyte-like* », à savoir une polarisation des cellules, une expression de certains marqueurs hépatiques et un ralentissement de la croissance cellulaire (Sainz et Chisari, 2006). Ces cellules sont permissives au HCV et constituent un outil beaucoup plus proche de la physiologie que les cellules Huh7 classiques. De plus, elles permettent de réaliser des études à long terme, mimant ainsi la chronicité de l'infection (Bauhofer *et al.*, 2012).

Actuellement, le modèle le plus proche de la physiologie hépatique demeure les PHH, provenant de résections hépatiques. Plusieurs équipes ont réalisé avec succès des infections de PHH mis en culture, grâce à des sérums de patients infectés (Gondeau *et al.*, 2014). Cependant, les taux d'infections observés étaient faibles et les expériences se sont révélées difficiles à reproduire (pour revue, voir Steinmann et Pietschmann, 2013). Une autre étude récente a décrit une méthode de culture des PHH permettant d'obtenir un cycle viral dans son intégralité, incluant la production de particules virales infectieuses nommées HCVpc pour *primary culture-derived HCV* (Podevin *et al.*, 2010). L'utilisation des PHH reste cependant très limitée par leur rareté, par la variabilité entre les donneurs et par la perte rapide de leurs propriétés hépatiques en culture (Steinmann et Pietschmann, 2013).

VIII. Le cycle viral du HCV : connexion intime avec le métabolisme lipidique

Les différents modèles d'étude du HCV ont apporté une connaissance approfondie du cycle viral. HCV est un virus hépatotrope et son cycle de multiplication dans les hépatocytes se décline en 7 grandes étapes : (1) l'attachement et (2) l'entrée des LVP, (3) la fusion et la décapsidation des particules virales, (4) la traduction des protéines virales, (5) la réplication du génome ARN, (6) l'assemblage et (7) l'export des particules néosynthétisées. Ces étapes sont résumées sur le schéma ci-dessous et seront détaillées tout au long de ce chapitre (**Figure 30**). Une particularité remarquable du HCV est que toutes les étapes du cycle viral sont intimement liées au métabolisme lipidique hépatique (pour revue, voir Felmler *et al.*, 2013 et Popescu *et al.*, 2014). Cette particularité sera illustrée tout au long de la description des différentes étapes du cycle viral.

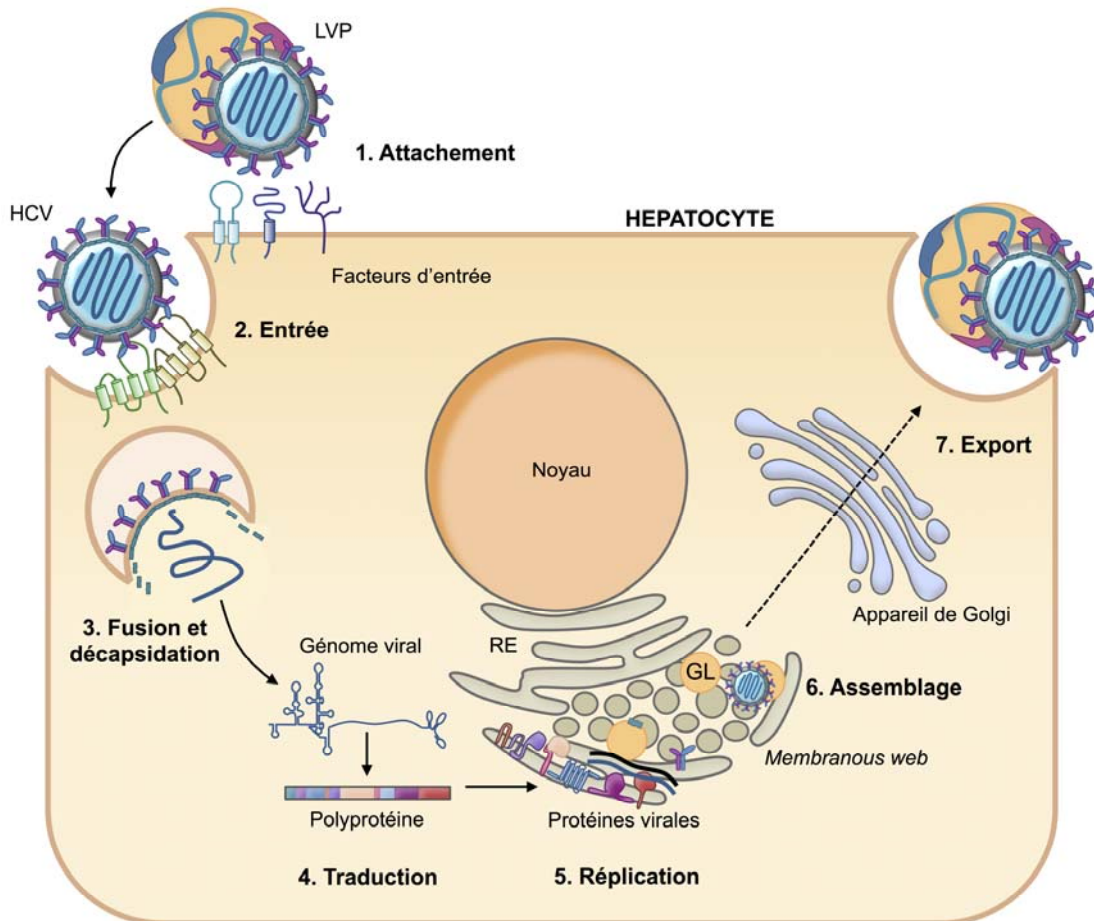


Figure 30. Cycle viral du HCV. Les LVP sont captées (1) à la surface des hépatocytes et entrent (2) dans la cellule en interagissant avec de nombreux facteurs d'entrée. Après fusion membranaire entre l'enveloppe virale et les endosomes suivie de la décapsulation (3), le génome est libéré dans le cytoplasme. Il est traduit en une polyprotéine (4) qui sera maturée pour donner 10 protéines virales s'ancrant dans les membranes du RE. Le génome viral est répliqué au niveau du *membranous web* issu de la prolifération des membranes du RE (5). Les particules virales sont ensuite assemblées à la surface des GL (6) et excrétées en passant par l'appareil de Golgi (7).

1. L'entrée virale : de l'attachement du virus à la fusion membranaire

HCV circule dans le sang des personnes infectées sous forme de LVP et entre au contact de la membrane basolatérale des hépatocytes, au niveau de l'espace de Disse. L'association du virus avec les lipoprotéines sanguines lui permet de s'attacher aux cellules en interagissant avec le LDLR et les glycosaminoglycanes (GAG) présents sur les HSPG (**Figure 31**) (Agnello *et al.*, 1999 ; Barth *et al.*, 2003). Bien que le LDLR permette l'attachement des LVP, il n'est pas indispensable à l'entrée virale (Albecka *et al.*, 2012). L'interaction du virus avec les facteurs d'attachement est rendue possible grâce à la présence d'apoE à la surface des LVP (Catanese *et al.*, 2013) En effet, apoE est une protéine de l'hôte indispensable à l'infectiosité des particules virales et à l'entrée du virus

dans les hépatocytes (Chang *et al.*, 2007 ; Jiang *et al.*, 2012 ; Lefevre *et al.*, 2014). Le récepteur SR-BI a également été décrit comme un facteur d'attachement de la LVP grâce sa capacité à lier les lipoprotéines (Catanese *et al.*, 2010).

L'entrée du virus dans les hépatocytes est ensuite initiée par l'interaction directe de des glycoprotéines d'enveloppes avec différents récepteurs cellulaires et par l'intervention indirecte de co-récepteurs (pour revue, voir Zeisel *et al.*, 2013 et Lindenbach et Rice, 2013). En plus de son intervention dans l'attachement des LVP, SR-BI peut interagir avec la glycoprotéine d'enveloppe E2, plus particulièrement avec la région HVR1 (Scarselli *et al.*, 2002 ; Dao *et al.*, 2012). De plus, la capacité du SR-BI à induire un influx de cholestérol à partir des lipoprotéines pourrait permettre la dissociation du virus de la lipoprotéine qui lui est associée (Dao *et al.*, 2012 ; Zahid *et al.*, 2013). La liaison SR-BI/E2 induit un changement de conformation d'E2 conduisant à l'exposition des déterminants de liaison à la tétraspanine CD81, permettant la liaison du virus à ce récepteur (**Figure 31**). CD81 a été le premier récepteur d'entrée à être identifié en 1998 (Pileri *et al.*, 1998). L'interaction spécifique du CD81 avec HCV permet d'expliquer la spécificité d'espèce du virus (Ploss *et al.*, 2009 ; Doerner *et al.*, 2013).

Un autre acteur majeur de l'entrée virale est la claudine 1 (CLDN1). Il s'agit d'une protéine membranaire localisée majoritairement aux jonctions serrées mais également à la membrane basolatérale des hépatocytes. CLDN1 a été identifiée, sous sa forme non associée aux jonctions serrées, comme un récepteur majeur de l'entrée du HCV (Evans *et al.*, 2007 ; Harris *et al.*, 2010 ; Mailly *et al.*, 2015). CLDN1 contribue à l'entrée virale en interagissant avec le complexe E1-E2 et le CD81 lorsqu'il est associé au virus, favorisant ainsi l'endocytose du virus (**Figure 31**) (Harris *et al.*, 2010 ; Krieger *et al.*, 2010, Lupberger *et al.*, 2011 ; Douam *et al.*, 2014). Le développement d'anticorps dirigés contre CLDN1 a permis de mettre en évidence le rôle crucial de cette protéine dans l'entrée virale. En effet, les anti-CLDN1 bloquent efficacement l'entrée du virus dans les hépatocytes *in vitro* et *in vivo*, et constituent une approche thérapeutique prometteuse (Krieger *et al.*, 2010, Fofana *et al.*, 2012 ; Mailly *et al.*, 2015).

L'interaction du CD81 à la CLDN1 dépend de l'activation de cofacteurs d'entrée comme *l'epidermal growth factor receptor* (EGFR) et de la GTPase HRas (Lupberger *et al.*, 2011 ; Zona *et al.*, 2013). Lorsque CD81 interagit avec E2, EGFR et HRAS sont activés et activent à leur tour une voie de signalisation cellulaire. Cette dernière induit la migration latérale du CD81 et son interaction avec CLDN1 (Lupberger *et al.*, 2011 ; Zona *et al.*, 2013). De même, l'activation de plusieurs RHO GTPases agit sur les filaments

d'actine cellulaires pour faciliter la migration du CD81 et l'endocytose du virus (**Figure 31**) (Farquhar *et al.*, 2008 ; Brazzoli *et al.*, 2008).

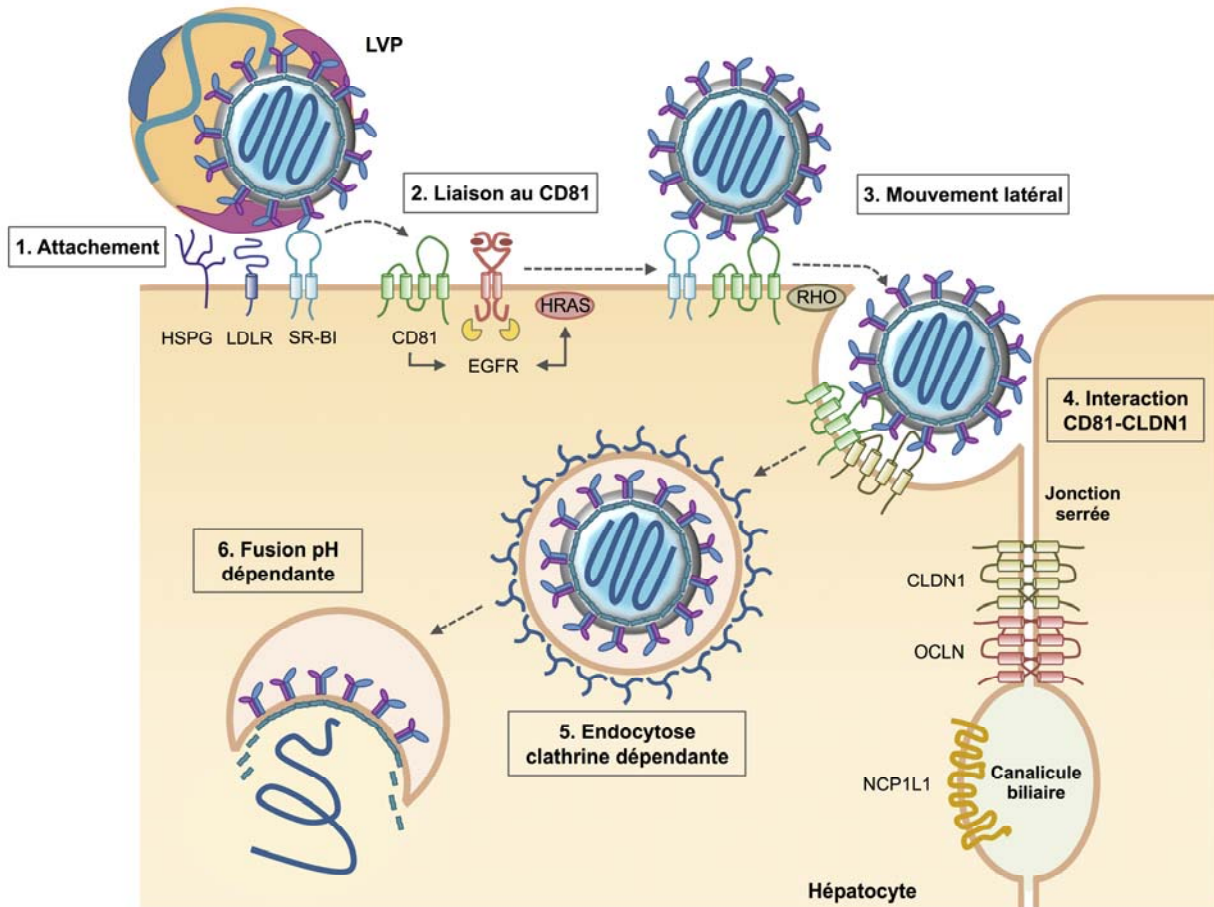



Figure 31. Entrée virale du HCV dans les hépatocytes. La LVP s'attache aux hépatocytes grâce aux HSPG, au LDLR (*via* apoE) et au SR-BI. SR-BI pourrait délipider les lipoprotéines associées au HCV. Il se lie également à E2, entraînant l'exposition des sites de liaison au CD81. E2 se lie ensuite au CD81 et active plusieurs voies de signalisation cellulaire *via* EGFR, HRAS et les RHO GTPases. Cette activation a pour conséquence un mouvement latéral du complexe CD81-HCV et l'interaction avec CLDN1. HCV est ensuite endocyté par une voie clathrine dépendante. Le pH acide des endosomes entraîne la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane des endosomes suivi de la décapsidation, libérant ainsi le génome viral dans le cytoplasme de la cellule. OCLN et NPC1L1 sont également des acteurs de l'entrée virale mais leur rôle exact dans ce processus reste encore inconnu.

En 2009, une étude a identifié une autre protéine des jonctions serrées, nommée occludine (OCLN) comme étant un facteur d'entrée virale. Tout comme CD81, OCLN explique la spécificité d'espèce du HCV pour les hépatocytes humains. Cependant, le rôle précis de l'OCLN dans le phénomène d'entrée reste encore à définir (Ploss *et al.*, 2009). Il a néanmoins été démontré qu'HCV augmente son expression (Branche *et al.*, 2016). Enfin, plus récemment, le *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1) a été défini comme un cofacteur additionnel nécessaire à l'entrée du virus. Il s'agit d'une protéine située à la surface apicale

des hépatocytes, au niveau des canalicules biliaires, qui est impliquée dans la réabsorption du cholestérol. Son rôle exact dans l'entrée virale est inconnu. Cependant, il est plus que probable que NPC1L1 exerce un effet indirect sur l'entrée virale en régulant le taux de cholestérol cellulaire (Sainz *et al.*, 2012).

La particule virale est endocytée par voie clathrine-dépendante et circule dans la cellule dans les endosomes précoces (**Figure 31**) (Blanchard *et al.*, 2006 ; Meertens *et al.*, 2006 ; Coller *et al.*, 2009 ; Farquhar *et al.*, 2012). L'interaction d'E2 avec le CD81 a induit



DC-SIGN et L-SIGN : taxis moléculaires?

En 2003, d'autres facteurs cellulaires pouvant lier E2 furent décrits. Il s'agit des lectines de type C nommées DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*), et L-SIGN (*liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing integrin*). Bien que n'étant pas exprimées au niveau des hépatocytes, ces protéines sont considérées comme des facteurs d'entrée. Les DC-SIGN sont fortement exprimées à la surface des cellules dendritiques et des cellules de Kupffer tandis que les L-SIGN sont retrouvées en abondance à la surface des cellules endothéliales des capillaires sinusoides du foie. Ces deux types de lectines semblent nécessaires à l'entrée de HCV dans les cellules dendritiques. Elles participeraient également à la capture du virus par les cellules hépatiques en favorisant la concentration du virus à proximité des hépatocytes. Elles participent ainsi à la dissémination du virus dans son organe cible (Cormier *et al.*, 2003 ; Gardner *et al.*, 2004).

au préalable un changement de conformation d'E2 la « préparant » en quelque sorte à la fusion virale. L'enveloppe virale fusionne ensuite avec la membrane des endosomes. Après décapsidation, le génome viral est libéré dans le cytoplasme de la cellule (Sharma *et al.*, 2011). Cette étape n'est pas encore totalement élucidée.

La dissémination du virus dans le foie peut avoir lieu par deux mécanismes différents : l'infection directe des cellules par le virus, comme décrit ci-dessus, et l'infection cellule à cellule vers les hépatocytes adjacents. Cette dernière s'avère être plus efficace pour propager le virus que l'infection directe et permet l'évasion du virus aux nAbs (Timpe *et al.*, 2008 ; Brimacombe *et al.*, 2011). Bien que les mécanismes de transmission soient différents, certains récepteurs et corécepteurs sont également impliqués dans la transmission de cellule à cellule comme SR-BI, CLDN1, OCLN, et EGFR (Timpe *et al.*, 2008 ; Xiao *et al.*, 2014). CD81 peut être impliqué dans ce phénomène mais ne semble pas indispensable (Witteveldt *et al.*, 2009).

2. Traduction de la polyprotéine virale

Après l'entrée du virus dans les hépatocytes, l'ARNsb de polarité positive du virus est directement traduit dans le cytoplasme, à proximité du RE. Contrairement à la majorité des ARNm cellulaires traduits par un mécanisme cap-dépendant, le génome viral est traduit

grâce à l'utilisation d'un IRES, localisé dans la partie 5'UTR du génome. Cet IRES permet le recrutement direct du ribosome en s'affranchissant d'un certain nombre de facteurs d'initiation de la traduction classique (eIF) (pour revue, voir Niepmann, 2013).

a) Rappel sur l'initiation de la traduction cap-dépendante

Chez les Eucaryotes, l'initiation de la traduction canonique, ou cap-dépendante, est un processus complexe et hautement régulé. Elle nécessite au total 9 facteurs d'initiation nommés eIF (*eukaryotic initiation factor*). Elle dépend également de 2 structures caractéristiques des ARNm qui sont la coiffe, située en 5' de l'ARNm, et la queue polyA située en 3'. Ces deux structures protègent l'ARNm des dégradations par les exonucléases. La coiffe correspond à une guanosine méthylée en position N7 (m7G), liée au nucléotide suivant par une liaison 5'-5' triphosphate. La queue polyA, d'environ 200 nts, est tapissée par une protéine nommée PABP pour *PolyA binding protein*. Lors de l'initiation de la traduction, les ARNm sont circularisés grâce au complexe eIF4F qui relie la coiffe et la PABP (eIF4F = eIF4E liant la coiffe + eIF4A + eIF4G liant la PABP). Il recrute ensuite le complexe de pré-initiation 43S composé de la petite sous-unité 40S du ribosome, du complexe ternaire eIF2/GTP/Met-tRNAi^{Met}, et des facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5. Le ribosome scanne ensuite la partie 5' UTR en association avec eIF4A et eIF4B. Lorsque l'anticodon du Met-tRNAi^{Met} reconnaît le codon initiateur AUG (formation du complexe 48S), eIF5 hydrolyse le GTP lié à eIF2. La dissociation d'eIF2-GTP et d'eIF3 de la sous-unité 40S, permet la liaison de la sous-unité 60S du ribosome grâce à eIF5B-GTP. Enfin, la formation du ribosome complet 80S et la dissociation des facteurs d'initiation permet l'élongation de la chaîne protéique (Jackson *et al.*, 2010).

b) Traduction IRES-dépendante du HCV

Contrairement à la voie canonique, la traduction IRES-dépendante permet le recrutement direct du ribosome et ne nécessite que peu de facteurs d'initiation (principalement eIF2 et eIF3). La traduction IRES-dépendante constitue donc un avantage pour le virus par rapport aux ARNm cellulaires. En effet, sous l'effet d'un stress ou d'une infection virale, un mécanisme de défense de la cellule consiste à réprimer la traduction cap-dépendante et seuls les ARN possédant un IRES peuvent être traduits (Sonenberg et Hinnebusch, 2009).

Comme décrit précédemment, la région 5'UTR du HCV est formée de quatre domaines majeurs structurés en tige-boucles (Moradpour et Penin, 2013). Les domaines II, III et IV ainsi que les premiers nucléotides de la phase codante forment un IRES (Brown *et al.*, 1992 ; Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992 ; Wang *et al.*, 1993). Les domaines II et III sont structurés en tiges-boucles (nommées IIa-IIb et IIIa-IIIf, respectivement) alors que le domaine IV, renfermant le codon initiateur AUG, adopte une structure en éperon (**Figure 32**). Le cœur de l'IRES est caractérisé par une jonction à quatre voies à la base du domaine III, entre les tiges boucles IIIc, IIIe, IIIf et le domaine IV, formant ainsi un double pseudo-nœud. Ces structures particulières confèrent à l'IRES une grande flexibilité. En effet, des études de microscopie électronique ont révélé que le domaine III se lie dans une conformation étirée à la sous-unité 40S du ribosome grâce aux interactions avec le domaine III (**Figure 32**). Ce changement de conformation permet à l'ARN viral de se positionner correctement et de rendre le codon initiateur AUG accessible au ribosome. Ainsi, contrairement à la voie canonique, la traduction IRES-dépendante du HCV ne nécessite pas la présence de la coiffe en 5' et permet le recrutement direct de la sous-unité 40S du ribosome au codon AUG, sans processus de *scanning* (Lukavsky, 2009 ; Niepmann 2009 ; Niepmann, 2013 ; Perard *et al.*, 2013 ; Quade *et al.*, 2015).



IRES : piste d'atterrissage pour ribosomes

Les premiers IRES ont été identifiés en 1988 chez deux *Picornaviridae*, le Poliovirus et l'EMCV (Jang *et al.*, 1988; Pelletier et Sonenberg, 1988). À l'origine, l'IRES du Polyovirus était nommé « *ribosome landing pad* », soit littéralement « piste d'atterrissage pour ribosome ». D'autres IRES ont par la suite été caractérisés chez les *Flaviviridae*, les *Retroviridae*, certains virus d'insectes comme les *Dicistroviridae* et même pour certains ARNm cellulaires exprimés en condition de stress. Environ 10% des ARNm cellulaires seraient traduits selon un mécanisme cap-indépendant. À l'heure actuelle, les IRES viraux sont classés en 4 groupes en fonction des facteurs de l'hôte nécessaires à leur fonctionnement. L'IRES du HCV appartient au groupe III (Niepmann, 2009).

L'IRES recrute ensuite le complexe ternaire eIF2/GTP/Met-tRNA^{Met}. L'interaction est stabilisée par la fixation du facteur eIF3 qui se lie aux sous-domaines IIIb (**Figure 32**). Ce mécanisme direct permet de s'affranchir d'un certain nombre de facteurs d'initiation (eIF1, eIF1A, eIF4A, eIF4B et eIF4F). L'hydrolyse du GTP suite à la formation du complexe 48S permet la liaison de la sous-unité 60S pour former le ribosome 80S (**Figure 32**) (Lukavsky, 2009 ; Niepmann, 2013). L'interaction de la sous-unité 40S du ribosome avec le domaine II de l'IRES induit un changement de conformation de la sous-unité 40S et permet l'hydrolyse du GTP et la libération du facteur eIF2. Le domaine II promeut ainsi l'association de la sous-unité 60S du ribosome au complexe d'initiation de la traduction et permet ainsi la transition de l'initiation à l'élongation (Locker *et al.*, 2007 ; Fraser *et al.*,

2009). La traduction IRES-dépendante du génome viral donne naissance à la polyprotéine virale qui sera clivée et maturée en 3 protéines structurales (Core, E1 et E2) et 7 protéines non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Moradpour et Penin, 2013).

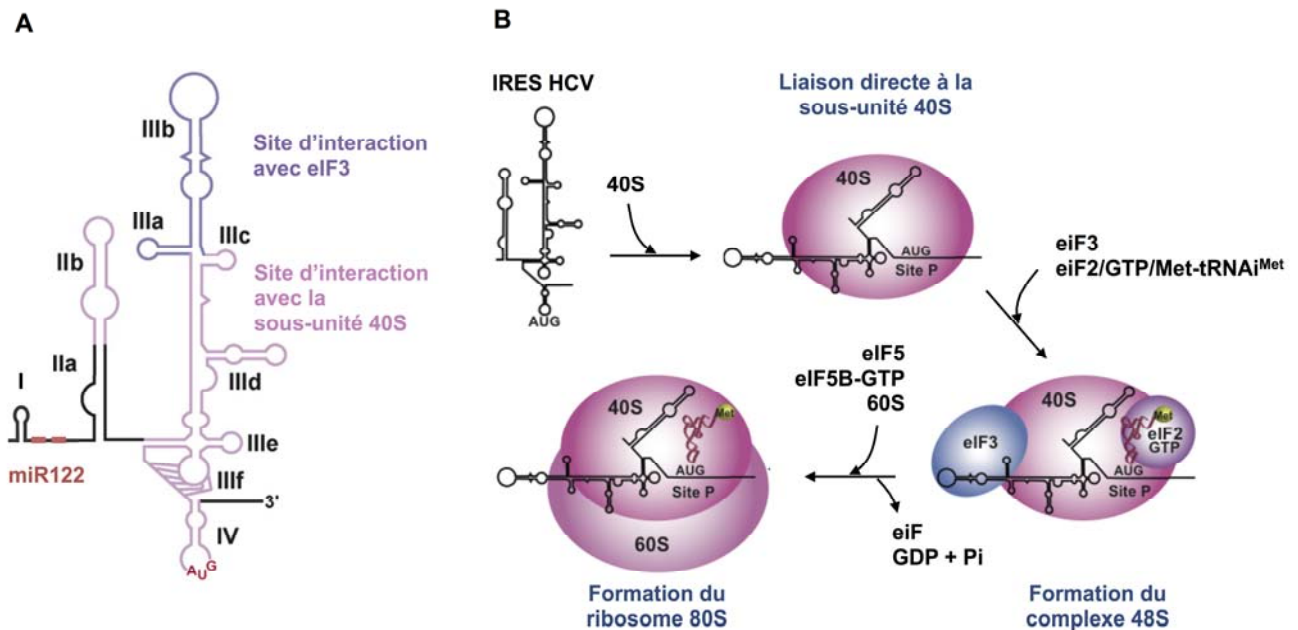


Figure 32. Structure de l'IRES du HCV et initiation de la traduction IRES-dépendante. (A) Structure de l'IRES du HCV. La région 5' UTR du génome viral est formée de 4 domaines très structurés (I à IV). L'IRES est formé des domaines II, III et IV et des premiers nucléotides de la région codante. Les domaines II et III sont divisés en sous-domaines IIa-IIIb et IIIa-IIIe respectivement. Le site de liaison à eIF3 est représenté en violet et le site de liaison à la sous-unité 40S du ribosome en rose. Les sites de fixation du mir122 sont représentés en rouge entre les boucles I et IIa. Le codon initiateur AUG est présenté en rouge dans le domaine IV. **(B)** Modèle d'initiation de la traduction IRES-dépendante du HCV. L'IRES recrute directement la sous-unité 40S du ribosome (rose), puis eIF3 (bleu) et le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-tRNAi^{Met} (violet) pour former le complexe d'initiation 48S. La formation du ribosome 80S dépend ensuite de eIF5 et eIF5B et de l'hydrolyse du GTP. Figure adaptée de Lukavsky, 2009.

c) Facteurs influençant la traduction IRES-dépendante du HCV

Bien que longtemps controversé, le rôle de la région 3'UTR du HCV dans la traduction virale est maintenant admis. Tout comme la queue polyA, il a été démontré que la région poly(U/UC) et la SL1 de la région conservée X stimulent la traduction IRES-dépendante (Song *et al.*, 2006 ; Badrick *et al.*, 2006 ; Bung *et al.*, 2010). La boucle SL1 étant également indispensable à la réplication virale, elle pourrait être impliquée dans la transition entre la traduction et la réplication virale (Friebe et Bartenschlager, 2002 ; Yi et Lemon, 2003). De plus, il a récemment été décrit que des structures tiges-boucles de la région 3' UTR se lient à l'IRES pour former une boucle fermée, tout comme les ARNm

cellulaires. Ce mécanisme permettrait d'assurer une traduction efficace uniquement des génomes complets non dégradés (Bai *et al.*, 2013 ; Romero-López *et al.*, 2014).

Bien que s'affranchissant de certains facteurs canoniques de l'initiation de la traduction, la traduction IRES-dépendante du HCV nécessite la présence de plusieurs facteurs de l'hôte. En effet, l'IRES recrute plusieurs facteurs non canoniques comme les protéines *La*, NSAP1, hnRNP L, hnRNP D, IMP-1, Gemin5, LSm1-7 et PCBP2. La plupart de ces protéines est normalement impliquée dans la régulation du métabolisme des ARN cellulaires mais ne sont pas impliquées dans la traduction cap-dépendante. Cependant, elles ont été décrites comme des ITAF (*IRES trans-acting factors*) car elles stimulent la traduction IRES-dépendante certainement en chaperonnant l'ARN viral (pour revue, voir Niepmann, 2013). Très récemment, une étude, réalisée dans notre laboratoire, a également identifié la protéine RACK1 (*Receptor for activated C kinase 1*) comme un facteur de l'hôte indispensable à la traduction virale. Il s'agit d'un composant de la sous-unité 40S du ribosome qui régule la traduction IRES-dépendante du HCV chez l'Homme mais aussi d'autres virus à IRES dont certains virus d'insectes (Majzoub *et al.*, 2014).

Enfin, le micro-ARN 122 (miR122) a été identifié comme un facteur de l'hôte stimulant la traduction et la réplication du HCV. Le miR122 est fortement exprimé dans le foie où il régule de nombreux processus cellulaires. En association avec certains récepteurs d'entrée, il contribue fortement à l'hépatotropisme du virus. Le miR122 stimule la traduction virale en se fixant de manière imparfaite dans la partie 5' UTR du génome viral, plus précisément sur 2 séquences cibles situées entre les domaines I et II. Une autre séquence cible du miR122 a été identifiée en 3'UTR mais ne semble pas impliquée dans la régulation de la traduction (Jopling *et al.*, 2005, Henke *et al.*, 2008 ; Conrad et Niepmann, 2014). Le miR122 exerce ses fonctions en stabilisant le génome du HCV, en le protégeant des dégradations et en contribuant ainsi à son accumulation dans les cellules hôtes (Jopling *et al.*, 2005 ; Shimakami *et al.*, 2012). De plus, les fonctions du miR122 sont indissociables du complexe ribonucléoprotéique miRISC (*miRNA-induced silencing complex*) qui lui est associé. La protéine argonaute 2 (Ago2) par exemple se lie à la partie 5' UTR du génome viral *via* miR122, stabilise le génome viral et stimule sa traduction (Conrad *et al.*, 2013). Bien que les mécanismes exacts restent encore mal compris, une hypothèse serait que la liaison du miR122 améliore l'association des ribosomes à l'ARN viral en induisant des changements de conformation de l'IRES (Henkel *et al.*, 2008).

3. Réplication du génome viral

a) Mécanisme de réplication

Après la traduction et le clivage de la polyprotéine virale, le complexe de réplication viral se forme au RE. Il est composé des protéines NS3 à NS5B et de l'ARN génomique. Bien que la protéine NS2 ne soit pas impliquée dans le complexe de réplication, elle est indirectement nécessaire à la réplication virale en assurant le clivage de la jonction NS2/NS3. La première étape de la réplication virale est la génération d'un ARN de polarité négative (ARN⁻), complémentaire à l'ARN génomique, qui constitue un intermédiaire de réplication. L'ARN⁻ servira de matrice pour produire à nouveau des ARN de polarité positive (ARN⁺), produits 5 à 10 fois plus que l'ARN⁻. La synthèse est initiée *de novo* à l'extrémité de la région 3' UTR grâce à l'ARN polymérase ARN dépendante NS5B et nécessite la génération d'un intermédiaire de réplication ARNdb. Les ARN⁺ ainsi générés peuvent être à nouveau traduits et répliqués ou encapsidés pour former de nouveaux virions (pour revue, voir Lohmann, 2013 et Paul *et al.*, 2014). Comme décrit précédemment, l'initiation *de novo* est une caractéristique de la protéine NS5B. Pour cela, elle adopte une conformation « fermée » où l'élément *linker* interagit avec l'élément *β flap* afin de former une plateforme pour l'incorporation du premier dinucléotide. L'élongation est ensuite déclenchée par un changement de conformation vers une forme « ouverte », qui permet la libération du site actif (Harrus *et al.*, 2010 ; Mosley *et al.*, 2012). La polymérase synthétise ensuite l'ARN viral à une vitesse estimée de 100 à 400 nt par minute (Simister *et al.*, 2009).

La réplication du génome viral est régulée en *cis* par des éléments très structurés de l'ARN viral, situés en majeure partie dans les parties 5'UTR et 3' UTR ainsi que dans les régions codant core et NS5B. Il s'agit des éléments CRE pour *cis-acting RNA elements* (Lohmann, 2013). La région X, située en 3' UTR de l'ARN⁺ contient principalement les éléments CRE nécessaires à la synthèse de l'ARN⁻ (Friebe et Bartenschlager, 2002). Elle est engagée dans une interaction de type *kissing-complex* avec un autre élément CRE situé dans la région codant NS5B. Cette interaction joue un rôle crucial dans la synthèse de l'ARN⁻ (Friebe *et al.*, 2005). Les éléments CRE situés en 3'UTR de l'ARN⁻, très différents des éléments CRE de l'ARN⁺, sont quant-à-eux indispensables à la synthèse de l'ARN⁺ (Friebe et Bartenschlager, 2002).

Bien que NS5B soit la protéine majoritairement responsable de la réplication du génome viral, d'autres protéines non structurales sont impliquées dans ce processus. NS4B

est notamment impliquée dans la formation du *membranous web*, le site de réplication du virus. NS5A quant-à-elle interagit avec des facteurs de l'hôte indispensables à la réplication (Lohmann, 2013). NS3 associée à NS4A contribue également à la réplication en particulier par son activité hélicase qui déroule les structures tiges-boucles de l'ARN viral et les formes ARNdb répliquatives (Gu et Rice, 2010).

b) Formation du *membranous web*

Tout comme les autres virus à ARN de polarité positive, HCV induit de nombreuses modifications des membranes cellulaires, à son profit, pour générer de véritables organelles spécialisées dans la réplication virales, nommées *viral replication factories* (vRF). Elles permettent d'augmenter localement la concentration des facteurs nécessaires à la réplication virale, la coordination spatiale des différentes étapes du cycle viral (traduction, réplication, assemblage) et la protection de l'ARN viral des défenses immunitaires de la cellule (Paul *et al.*, 2014). En effet, des études de microscopie électronique ont révélé que les complexes de réplication du HCV étaient intégrés dans une matrice membranaire appelée *membranous web* (MW) (Egger *et al.*, 2002 ; Gosert *et al.*, 2003) (**Figure 33**). La plupart des altérations des membranes engendrées par le virus forment des structures complexes à deux membranes ou plus, nommées *double-membrane vesicles* (DMV) ou *multi-membranes vesicles* (MMV) (Ferraris *et al.*, 2010 ; Reiss *et al.*, 2011). Ces altérations ont pour origine des protrusions du RE (Romero-Brey *et al.*, 2012). Il a été démontré que les protéines non-structurales et l'ARN viral sont localisés dans les DMV (**Figure 33**). De plus, l'abondance des DMV dans la cellule corrèle avec le taux de réplication virale, témoignant du rôle fonctionnel de ces structures (Romero-Brey *et al.*, 2012).

La protéine virale NS4B a été identifiée comme l'acteur majeur permettant la formation du MW, car sa seule expression permet la prolifération des membranes du RE (Egger *et al.*, 2002). La structure intégralement membranaire de la protéine et son oligomérisation induisent des courbures dans les membranes du RE et la génération des DMV. En effet, des mutations de la protéine inhibant l'oligomérisation de NS4B mènent à la formation de DMV aberrantes et une inhibition de la réplication virale (Gouttenoire *et al.*, 2010b ; Paul *et al.*, 2011). L'expression indépendante des protéines virales dans les hépatocytes a démontré que les protéines NS3/NS4 NS5A et NS5B étaient également impliquées dans la formation de vésicules membranaires contenues dans le MW, mais différant quelque peu

des DMV et MMV. Leur rôle exact reste encore à déterminer (Romero-Brey *et al.*, 2012).

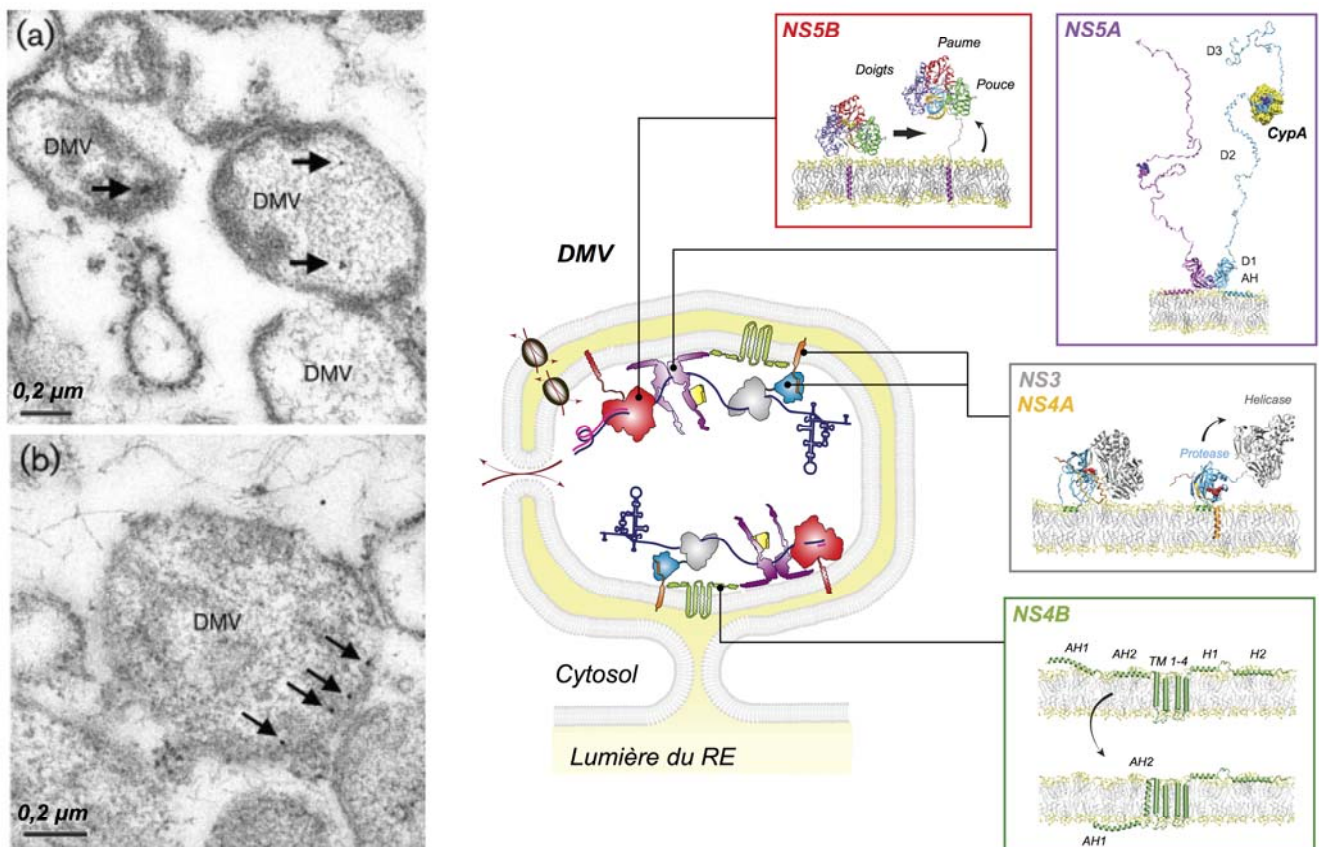


Figure 33. DMV et complexe de réplication virale. **Panel de gauche.** Clichés de microscopie électronique montrant les structures DMV dans des cellules Huh7.5 exprimant fortement le réplicon subgénomique du JFH1. Un marquage *immunogold* des ARNdb du HCV (a) et de la protéine NS5A (b) a été réalisé pour montrer leur localisation dans les DMV. Photographie adaptée de Ferraris *et al.*, 2010. **Panel de droite.** Représentation schématique des DMV dérivées du RE et de la formation du complexe de réplication. Les protéines NS3/NS4A, NS4B, NS5A et NS5B ainsi que l'ARNsb viral et les formes répliquatives ARNdb y sont retrouvés. Il est à noter que le complexe de réplication a aussi été visualisé sur la partie externe des DMV, exposée vers le cytoplasme (non détaillé). Les changements de conformation nécessaires aux protéines virales pour promouvoir la réplication virale sont illustrés dans les encadrés à droite du schéma. Figure adaptée de Paul *et al.*, 2014.

c) Importance des facteurs de l'hôte et du métabolisme des lipides

Bien que les protéines virales soient les acteurs principaux de la modification des membranes du RE, certains facteurs de l'hôte sont indispensables à la formation des vRF et à la réplication virale. C'est le cas notamment de la cyclophiline A (CypA) (Kaul *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2009). CypA est une prolyl-peptidyl isomérase (PPI) qui se lie à NS5A et qui induit des changements conformationnels importants des domaines II et III de la protéine. Ces derniers permettent d'augmenter la capacité de liaison à l'ARN de NS5A et d'améliorer la réplication virale. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de CypA bloque la

réplication virale, démontrant l'importance de ce facteur hôte dans la réplication du virus (Coelmont *et al.*, 2010 ; Foster *et al.*, 2011 ; Verdegem *et al.*, 2011). L'activité PPI de CypA est également essentielle à NS5A dans le processus de formation du MW par un mécanisme encore inconnu (Madan *et al.*, 2014). Un autre exemple est la *proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2* (PSTPIP2). Cette protéine est recrutée par NS4B et NS5A au site de réplication et participe à la formation des DMV en induisant la courbure des membranes (Chao *et al.*, 2012).

Néanmoins, le facteur influençant le plus la réplication virale reste la composition en lipide du MW (Syed *et al.*, 2010). HCV induit la synthèse *de novo* des lipides *via* les facteurs de transcription SREBP, induisant ainsi des changements dans la composition des membranes cellulaires spécifiques à l'infection (Warris *et al.*, 2007 ; Park *et al.*, 2009 ; Diamond *et al.*, 2010). Il a en effet été observé que l'expression des protéines Core et NS4B promouvaient indirectement le clivage et l'activation des SREBP, menant à une forte expression de la FAS et de l'HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme-A réductase), deux enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras et du cholestérol respectivement (Warris *et al.*, 2007 ; Park *et al.*, 2009). Il est à noter que la FAS stimule elle-même l'activité de NS5B (Huang *et al.*, 2013). Le cholestérol joue un rôle-clé dans la réplication virale (pour revue, voir Felmler *et al.*, 2013 et Popescu *et al.*, 2014). En effet, la réplication a lieu au niveau de micro-domaines membranaires du MW enrichis en cholestérol nommés *lipid-raft* (Shi *et al.*, 2003 ; Aizaki *et al.*, 2004). Il a été démontré que la perturbation du métabolisme du cholestérol inhibe la formation du complexe de réplication en altérant la structure membranaire du MW (Sagan *et al.*, 2006). De plus, l'inhibition de l'HMG-CoA bloque la réplication du HCV (Ye *et al.*, 2003).

L'importance du métabolisme des lipides est également illustrée par la grande dépendance de la réplication virale à la PI4KIII α , une enzyme impliquée dans la synthèse du PI4P. Les protéines NS5A et NS5B interagissent et activent cette enzyme, induisant ainsi une forte production de PI4P dans les membranes cellulaires. Il a été démontré que le *silencing* de PI4KIII α diminue fortement la taille des DMV et inhibe la formation des MMV, suggérant que la production de PI4P est un facteur indispensable à la formation du MW (Berger *et al.*, 2011 ; Reiss *et al.*, 2011). De plus, PI4KIII α affecte directement la réplication virale en régulant la phosphorylation de NS5A (Reiss *et al.*, 2013). Une voie de transport liée au PI4P et impliquant l'*oxysterol-binding protein* (OSBP) est également cruciale pour la formation du MW ainsi que pour la sécrétion des particules virales

infectieuses (Amako *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2014). OSBP permet le transport du cholestérol aux membranes riches en PI4P et contribue à la formation des DMV (Wang *et al.*, 2014). De plus, une très récente étude a démontré que la cholestérol-25-hydroxylase, une protéine induite par l'IFN en réponse à l'infection par HCV, restreint la réplication virale en bloquant la protéine OSBP, diminuant ainsi la formation des DMV. Cette étude renforce l'importance d'OSBP dans la réplication du virus (Anggakusuma *et al.*, 2015).

Enfin, en plus de son rôle dans la régulation de la traduction virale, le miR122 apparaît comme un élément important pour la réplication du virus. Il influence cette étape du cycle viral directement en stabilisant l'ARN génomique (Jopling *et al.*, 2005 ; Shimakami *et al.*, 2012) et indirectement par son rôle régulateur du métabolisme du cholestérol. En effet, la déplétion de miR122 dans les hépatocytes induit une accumulation de cholestérol cellulaire et diminue la quantité de cholestérol circulant (Hsu *et al.*, 2012 ; Tsai *et al.*, 2012).

Ces quelques exemples démontrent l'importance du métabolisme lipidique pour la réplication du virus mais ne constituent pas une liste exhaustive. En effet, bien d'autres facteurs régulant la production, la capture ou encore l'efflux des lipides influencent également la réplication virale. C'est le cas notamment d'apoE, grâce à son rôle régulateur du métabolisme des lipides. **L'étude du rôle d'apoE dans la réplication virale a constitué la majeure partie de ce travail de thèse (voir Crouchet *et al.*, Gut, 2016).**

4. Assemblage et export des particules virales

La dernière étape du cycle viral correspond à l'assemblage et l'export des particules virales infectieuses qui bourgeonnent au RE. Elle nécessite une organisation spatiale et temporelle millimétrée pour permettre l'assemblage de la protéine de capsid core, des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 ainsi que du génome viral. Les particules naissantes transitent par les voies de sécrétions cellulaires où elles sont maturées, avant d'être excrétées. Une fois encore, ces étapes sont intimement liées au métabolisme des lipides (pour revue, voir Lindenbach, 2013 et Paul *et al.*, 2014).

a) Le trafic intracellulaire de core : déterminant de l'assemblage viral

Le contrôle spatio-temporel de l'assemblage viral nécessite la séparation physique de la protéine de capsid Core du complexe de réplication, pour éviter une liaison à l'ARN viral et une encapsidation précoce. Après sa synthèse au RE, la protéine core s'homodimérise et est dirigée à la surface des GL cytosoliques (cGL) (**Figure 34**) (Boulant *et al.*, 2006). Ces

cGL sont des organites spécialisés dans le stockage des lipides neutres et du cholestérol, entourés d'une monocouche lipidique dérivée du RE permettant l'interaction avec Core (Roingard et Depla, 2011). Ce processus permettrait de séquestrer Core durant l'étape de réplication virale jusqu'à ce qu'elle soit nécessaire à l'assemblage des particules virales. Cette hypothèse est confortée par plusieurs études montrant que des mutations de la protéine Core bloquant son trafic vers les cGL inhibent fortement l'assemblage viral (Boulant *et al.*, 2007 ; Miyanari *et al.*, 2007 ; Shavinskaya *et al.*, 2007). L'acheminement de Core aux cGL nécessite les protéines DGAT-1, une enzyme clé de la synthèse des TG (Herker *et al.*, 2010) et cPLA2G4A (*cytosolic phospholipase A2 group IVA*) dont l'activation est régulée par la voie des MAPK. La cPLA2G4A est impliquée dans le clivage des lipides cellulaires contenant de l'acide arachidonique. Il a été démontré que l'inhibition de cette enzyme bloquait l'assemblage viral, qui pouvait être restauré par l'ajout d'acide arachidonique. Ce dernier pouvant jouer le rôle de second messager de certaines voies de signalisation cellulaire, une hypothèse intéressante serait que cPLA2G4A régule le trafic de Core en activant une voie de signalisation dépendante de l'acide arachidonique (**Figure 34**) (Menzel *et al.*, 2012).

Pour initier l'assemblage viral, la protéine Core doit ensuite être acheminée des cGL au site d'assemblage des particules virales au RE. Plusieurs facteurs de l'hôte sont impliqués dans ce processus. Dans sa structure, la protéine Core contient le domaine conservé YXXØ (Y est une tyrosine, X correspond à n'importe quel aa et Ø correspond à un aa hydrophobe) qui est reconnu par AP2M1 (*clathrin assembly protein complex 2 medium chain $\mu 1$*). En 2012, Neveu et ses collaborateurs ont démontré l'importance de l'interaction entre Core et AP2M1 pour l'assemblage viral. En effet, l'inhibition de cette interaction induit une accumulation de Core aux cGL et une forte diminution de la production de virus (Neveu *et al.*, 2012). Des études de microscopie et de *live imaging* ont complété ces travaux, montrant que Core est très vite recrutée au cGL après sa synthèse, puis lentement déplacée aux sites d'assemblage dans des vésicules se déplaçant le long des microtubules (Counihan *et al.*, 2011 ; Coller *et al.*, 2012).

b) Assemblage et maturation des particules virales

La première étape de l'assemblage viral consiste en l'interaction de NS5A avec la protéine Core liée au cGL. Cette étape est assurée par DGAT-1 (Camus *et al.*, 2013). Pour passer des étapes de réplication à l'assemblage viral, NS5A doit être phosphorylée par la

CKII α sur un résidu sérine du domaine III. Grâce à son domaine de liaison à l'ARN, NS5A peut acheminer l'ARN néosynthétisé du site de réplication vers les sites d'assemblage (Appel *et al.*, 2008 ; Masaki *et al.*, 2008 ; Tellinghuisen *et al.*, 2008). Lors de cette étape les interactions entre NS2 et p7 mais également entre NS2 et NS3/NS4A sont indispensables pour acheminer les protéines non structurales et Core aux sites d'assemblage (Jirasko *et al.*, 2010 ; Popescu *et al.*, 2011). De plus, le complexe p7-NS2 recrute également les glycoprotéines E1 et E2, jusque là retenues au RE, aux sites d'assemblage (Phan *et al.*, 2009).

Une fois tous les composants regroupés, les particules virales sont assemblées. La nucléocapside est formée grâce à l'interaction de Core et de l'ARN viral puis elles vont bourgeonner au RE à proximité des LD pour acquérir leur enveloppe dans laquelle les protéines E1 et E2 sont enchâssées (**Figure 34**) (Roingeard *et al.*, 2008 ; Lindenbach, 2013). Cette étape est intimement liée à la voie d'assemblage des VLDL. L'assemblage des VLDL est réalisé en plusieurs étapes. Dans un premier temps, apoB-100 est synthétisée puis lipidée de manière co-traductionnelle au RE grâce à la MTP et aux DGAT-1 et 2 pour former les précurseurs des VLDL. Puis dans un second temps, les VLDL sont enrichies en lipides grâce aux GL lumineuses (luGL) au RE (Roingeard et Depla, 2011 ; Ramasamy, 2014). Le mécanisme d'enrichissement en lipides des VLDL est peu connu. Il semblerait que les précurseurs des VLDL fusionnent avec les luGL résidentes du RE, produites par la MTP et contenant apoE et apoC à leur surface (Davidson et Shelness, 2000 ; Olofsson *et al.*, 2009 ; Ye *et al.*, 2009) (**Figure 34**). Enfin, les VLDL sont maturées et sécrétées *via* les vésicules de l'appareil de Golgi (Gusarova *et al.*, 2003 ; Siddiqi, 2008).

Plusieurs évidences ont permis de démontrer que l'assemblage et l'export des particules infectieuses du HCV possèdent de nombreuses similitudes avec la voie de synthèse des VLDL. Il a été notamment démontré que des inhibiteurs de la MTP inhibaient la production de particules virales. Le rôle d'apoB reste quand-à-lui sujet à controverse ; alors que certaines études décrivent apoB comme indispensable à la production de particules virales, d'autres équipes ont démontré que la production de virions serait plutôt dépendante d'apoE (Huang *et al.*, 2007 ; Gastaminza *et al.*, 2008 ; Jiang *et al.*, 2012), Benga *et al.*, 2010). En accord avec ces observations, Coller et ses collaborateurs ont montré que les virus naissants étaient localisés dans des vésicules de sécrétion en association avec apoE, mais pas apoB (Coller *et al.*, 2012). Ces études suggèrent que la production de virus serait dépendante d'apoE et des luGL plutôt que de la production de VLDL en elle-même. Enfin, plusieurs études ont démontré que l'interaction entre apoE et

les protéines virales NS5A et E2 était indispensable à la production de particules virales infectieuses, prouvant à nouveau le rôle important d'apoE dans cette étape (Benga *et al.*, 2010 ; Boyer *et al.*, 2014 ; Lee *et al.*, 2014).

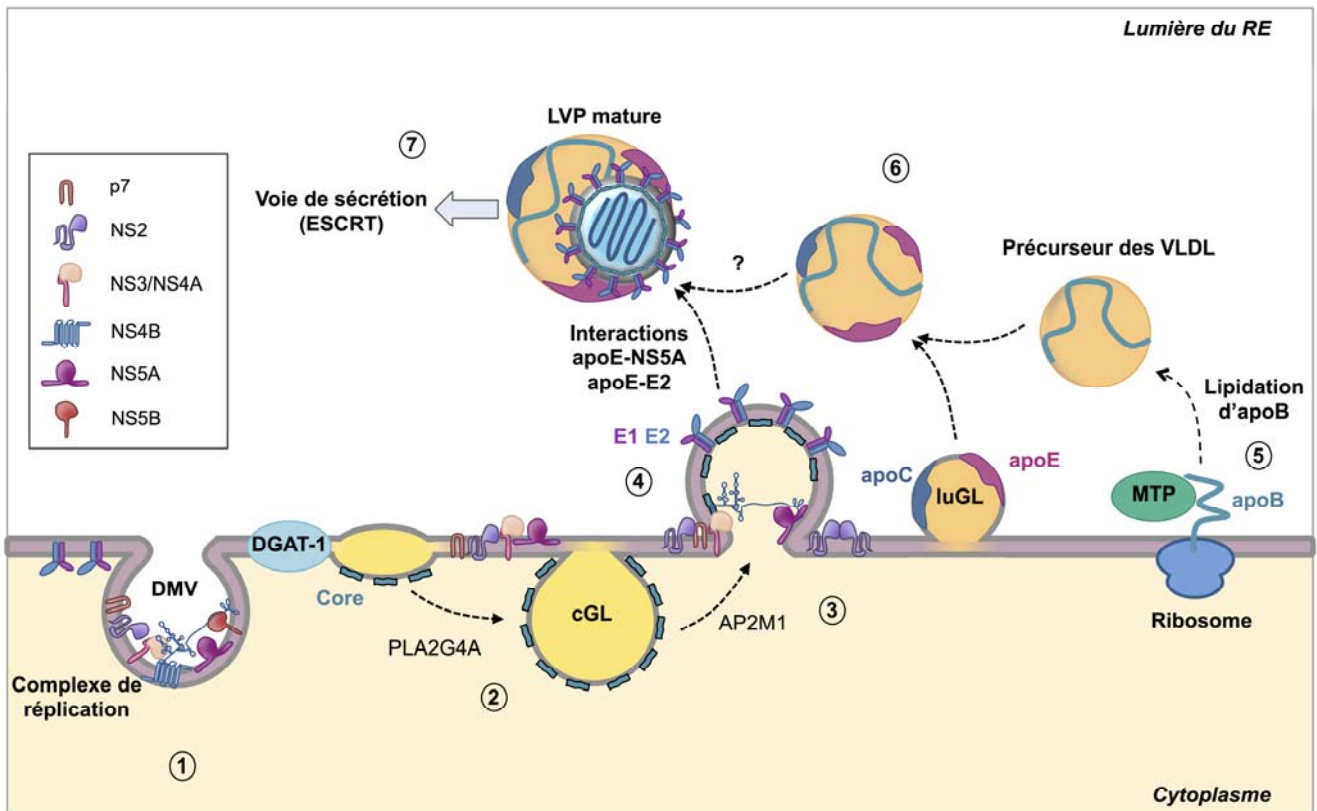


Figure 34. Assemblage et export des particules virales du HCV dans les hépatocytes.

(1) Le génome viral est répliqué au RE, au niveau des DMV. (2) Core est tout d'abord dirigée puis séquestrée aux cGL grâce à DGAT-1 et PLA2G4A. (3) Lors de l'étape d'assemblage, Core est acheminée aux sites d'assemblages grâce à AP2M1 et aux protéines non structurales p7, NS2 et NS3/NS4A. NS5A permet l'acheminement de l'ARN viral aux plateformes d'assemblage. Enfin, p7 et NS2 permettent le recrutement des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. (4) Les particules virales bourgeonnent aux sites d'assemblage viral à la surface du RE. (5) En parallèle, les précurseurs des VLDL sont formés par la lipodation co-translationnelle d'apoB grâce à la MTP. La MTP est aussi impliquée dans la production des luGL (non représenté). (6) Il a été proposé que les précurseurs des VLDL fusionnent avec les luGL contenant apoE et apoC à leur surface pour former des VLDL matures. Les particules virales infectieuses du HCV sont couplées aux VLDL naissantes par un mécanisme encore peu connu. ApoE et NS5A jouent un rôle majeur dans cette étape. (7) Enfin les particules virales sont excrétées de la cellule par la voie ESCRT. Figure adaptée de Zeisel, Crouchet *et al.*, 2015.

A ce stade, les particules virales formées peuvent être maturées et sécrétées. Les glycoprotéines E1 et E2 subissent de nombreuses glycosylations dans l'appareil de Golgi (Vieyres *et al.*, 2010). Puis, comme pour de nombreux virus enveloppés, les particules infectieuses du HCV empruntent la voie de *l'endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) pour être excrétées (Figure 34) (Welsch *et al.*, 2007 ; Ariumi *et al.*,

2011). Durant le trafic des particules dans les voies de sécrétion, la protéine p7 neutralise les compartiments acides grâce à son activité de pompe à proton pour protéger les particules de toutes modifications dues à des pH trop acides (Wozniak *et al.*, 2010).

OBJECTIFS DE LA THESE

L'infection par HCV est une cause majeure d'hépatite chronique, de cirrhose du foie et d'hépatocarcinome à travers le monde. Plusieurs stratégies thérapeutiques existent ou sont en cours de développement. A l'heure actuelle, les DAA ont permis une révolution des traitements pour lutter contre le virus, avec des taux de guérison très élevés. Ils permettront à l'avenir de s'affranchir de l'INFα. Bien que très efficaces, les DAA sont limités par leur coût et par l'apparition de résistances virales dues aux facultés d'adaptation du virus. Pour s'affranchir des problèmes de résistance, les HTA constituent une stratégie de choix car ils ciblent directement les facteurs de l'hôte indispensables au virus. L'identification d'un HTA, dépend de la bonne compréhension des interactions entre le virus et sa cellule hôte permettant de découvrir des cibles cellulaires potentiellement exploitables pour développer de nouvelles thérapies. A l'heure actuelle, aucun vaccin préventif n'est disponible. L'élaboration d'un tel vaccin se révèle difficile à cause de la grande variabilité du virus et de ses capacités d'échappement au système immunitaire. Le développement d'un vaccin passe également par la connaissance des relations entre l'immunité de l'hôte et le virus. Notre unité de recherche est spécialisée dans l'étude des interactions virus-hôte au cours du cycle viral et dans la compréhension des relations entre le virus et l'immunité de l'hôte.

Tout au long de mon introduction, nous avons pu voir le lien étroit entre le cycle viral du HCV et le métabolisme lipidique de la cellule hôte. Le virus circule notamment dans le sang des patients infectés associés aux lipoprotéines, sous forme d'une LVP infectieuse. Au cours des dernières années, notre laboratoire s'est particulièrement intéressé à une protéine de l'hôte faisant partie intégrante de la LVP nommée apoE. Cette protéine est indispensable à plusieurs étapes-clés du cycle viral du HCV. D'une part, elle est impliquée dans l'entrée du virus dans les hépatocytes en interagissant avec les HSPG et le LDLR (Chang *et al.*, 2007 ; Jiang *et al.*, 2012, Lefèvre *et al.*, 2014). D'autre part, elle est indispensable à l'assemblage et à l'export des particules virales néosynthétisées en participant à l'assemblage des VLDL et en interagissant avec les protéines virales E2 et NS5A (Huang *et al.*, 2007 ; Benga *et al.*, 2010 ; Boyer *et al.*, 2014 ; Lee *et al.*, 2014). Durant mon travail de thèse, j'ai pu contribuer à approfondir les connaissances quant au rôle d'apoE dans le cycle viral du HCV, sous deux aspects très différents. J'ai pu mettre en évidence le rôle régulateur de l'apoE libre extracellulaire dans l'étape de réplication virale

et dans le métabolisme lipidique et j'ai également participé à une étude démontrant le rôle d'apoE dans l'échappement du virus au système immunitaire de l'hôte.

Dans la première partie de mes travaux de thèse, je présenterai les résultats concernant le rôle d'apoE extracellulaire dans la régulation de la réplication virale. Je me suis plus particulièrement intéressée à la forme libre d'apoE c'est-à-dire apoE non liée aux lipoprotéines. En effet, malgré les nombreuses connaissances sur le rôle d'apoE dans le cycle viral, le rôle potentiel de l'apoE libre extracellulaire n'était que peu documenté. Mes travaux démontrent que l'apoE libre inhibe la réplication du HCV par son rôle régulateur du métabolisme des lipides, mécanisme que nous avons en partie élucidé. Ce travail a constitué l'essentiel de mon projet de thèse et a abouti à un article original, accepté pour publication dans le journal *Gut*.

Dans la seconde partie de mon travail, je présenterai ma contribution à une étude mettant en évidence le rôle d'apoE dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte. En effet, HCV a développé de nombreuses stratégies pour échapper aux défenses de l'hôte. Grâce à sa grande variabilité, il peut notamment échapper aux nAbs (Fafi-Kremer *et al.*, 2012). Plusieurs études ont également émis l'hypothèse que l'association du HCV aux lipoprotéines permettrait de masquer les glycoprotéines virales et de les rendre inaccessibles aux nAbs (Bartosch *et al.*, 2005, Grove *et al.*, 2008 ; Fafi-Kremer *et al.*, 2012). Au vu de ces observations, nos travaux ont porté sur le rôle de l'association du HCV avec les composants des lipoprotéines dans l'échappement au système immunitaire. Nous avons ainsi mis en évidence qu'apoE était impliquée dans le processus d'échappement aux nAbs en s'associant avec la glycoprotéine E2 et en masquant les épitopes reconnus par les nAbs. Cette étude a donné lieu à une publication dans le journal *Gastroenterology*.

Une troisième partie de mes travaux de thèse a été consacrée à l'évaluation de l'efficacité de nanoparticules, fonctionnalisées avec des siRNA dirigés contre des facteurs de l'hôte, pour lutter contre l'infection chronique par HCV. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de Biomatériaux et Bioingénierie (UMRS_1121, Strasbourg) Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise dans *Journal of Materials Chemistry B* sera présentée en annexe de ce manuscrit.

RESULTATS PREMIERE PARTIE

ApoE libre extracellulaire inhibe la réplication du HCV en induisant un efflux de cholestérol ABCG1-dépendant

I. Contexte de l'étude

ApoE est un acteur majeur du métabolisme des lipides. Elle possède de nombreux rôles dont la régulation du transport, la capture et la synthèse des lipoprotéines (Phillips, 2014). ApoE appartient à la famille des apo échangeables ; elle peut donc être échangée entre les différentes classes de lipoprotéines. De cette manière, elle régule à la fois le métabolisme des TRL et des HDL (Sundaram et Yao, 2012). Ses propriétés physiques lui permettent de passer facilement d'une forme liée aux lipoprotéines à une forme libre (Saito *et al.*, 2004, Hatters *et al.*, 2006). De plus, bien que la majeure partie de l'apoE biologiquement active soit liée aux lipoprotéines, apoE peut être sécrétée sous forme libre par les hépatocytes dans l'espace de Disse. Cette forme libre permettrait de faciliter la capture et l'élimination des TRL (Xiao *et al.*, 2011). D'autres études ont montré qu'apoE libre peut interagir avec le transporteur ABCA1 exprimé en particulier à la surface des hépatocytes et des entérocytes et induire un efflux de cholestérol, suggérant qu'apoE libre pourrait avoir un rôle dans le métabolisme des HDL (Kennedy *et al.*, 2005 ; Fitzgerald *et al.*, 2010). Malgré les nombreuses connaissances concernant le rôle d'apoE dans le métabolisme lipidique, le rôle exact de la forme libre d'apoE dans le métabolisme hépatique n'est que peu connu. De plus, au vu de l'importance d'apoE pour HCV, nous nous sommes demandé quel pouvait être le rôle de l'apoE libre sur la dynamique de réplication du virus et son impact sur le métabolisme lipidique.

Pour cela, nous avons utilisé le modèle d'étude HCVcc. Dans un premier temps, nos expériences ont été réalisées avec des cellules Huh7.5.1 électroporées avec un ARN viral et répliquant fortement le virus. Puis nous avons confirmé la majorité des résultats obtenus en utilisant des PHH, plus proches de la physiologie hépatique. Au cours de notre étude, nous avons utilisé une apoE humaine recombinante, produite chez *E.coli*, et non lipidée. Toutefois, afin de renforcer nos conclusions, nous avons confirmé les résultats les plus marquants avec de l'apoE purifiée à partir de sérum humain, pour exclure tout résultat aspécifique dû à l'absence de modifications post-traductionnelles sur l'apoE recombinante.

Les concentrations utilisées ont été déterminées en accord avec la littérature et sont proches de la physiologie. Avant de commencer nos expériences, nous nous sommes également assurés que cette forme d'apoE n'était pas toxique aux concentrations utilisées pour nos cellules en réalisant des tests de prolifération cellulaire.

II. Résultats

Les résultats concernant cette étude seront présentés sous forme d'un article scientifique accepté pour publication dans le journal *Gut*.

Extracellular lipid-free apolipoprotein E inhibits HCV replication and induces ABCG1-dependent cholesterol efflux

Emilie Crouchet^{1,2}, Mathieu Lefèvre^{1,2}, Eloi R. Verrier^{1,2}, Marine A. Oudot^{1,2}, Thomas F. Baumert^{1,2,3}, Catherine Schuster^{1,2*}

¹*Inserm, U1110: Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, Strasbourg, France*

²*Université de Strasbourg, Strasbourg, France*

³*Pôle hépato-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France*

*Corresponding author: Dr Catherine Schuster, UMR 1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France, Tel.: (+33) 3 68 85 37 41; Fax: (+33) 3 68 85 55 08; E-mail: catherine.schuster@unistra.fr

*Running title: *Lipid-free apoE inhibits HCV replication through ABCG1*

Keywords: apolipoprotein E, hepatitis C virus, cholesterol efflux, ABCG1, apoAI-HDL

ABSTRACT

Objective: The hepatitis C virus (HCV) life cycle and the lipid metabolism are inextricably intertwined. In the blood, HCV virions are associated with lipoproteins, forming lipovirions (LVP), which are the most infectious form of the virus. Apolipoprotein E (apoE), a key LVP component, plays an essential role in HCV entry, assembly, and egress. ApoE is also a cell host factor involved in lipoprotein homeostasis. Although the majority of apoE is associated with lipoproteins, a lipid-free form exists in blood. However, the role of lipid-free apoE in both lipid metabolism and HCV life cycle is poorly understood.

Design: In this study, using the HCVcc model system in human hepatoma Huh7.5.1 cells and primary human hepatocytes (PHH) we investigated the effect of lipid-free apoE (LF-apoE) on the early steps of HCV life cycle and on the lipid metabolism of hepatic cells.

Results: A dose-dependent decrease in HCV replication was observed when Huh7.5.1 cells and PHH were treated with increasing amounts of LF-apoE. We showed that LF-apoE acts on HCV replication independently of previously described apoE receptors. We observed that LF-apoE induced a marked hepatic cholesterol efflux *via* the ATP binding cassette sub-family G member 1 protein (ABCG1) that in turn inhibits HCV replication. LF-apoE also increases both apolipoprotein AI (apoAI) and high-density lipoprotein (HDL) production.

Conclusion: Our findings highlight a new mechanism in lipid metabolism regulation and interaction of the lipid metabolism with the HCV life cycle, which may be important for viral pathogenesis and might also be explored for antiviral therapy.

SUMMARY BOX

What is already known on this subject?

- HCV is associated with very-low- and low density lipoproteins (VLDL and LDL) to form an infectious lipoviroparticle (LVP)
- Apolipoprotein E (apoE) is a component of LVP that plays a key role in HCV life cycle.
- ApoE is a host factor involved in lipoprotein homeostasis existing in both lipoprotein-associated and lipid-free form.
- The role of lipid-free apoE (LF-apoE) in both lipid metabolism and HCV life cycle is poorly understood.

What are the new findings?

- LF-apoE dose-dependently decreases HCV replication.
- LF-apoE acts on HCV replication independently of previously described apoE receptors.
- LF-apoE induces ABCG1-dependent cholesterol efflux that inhibits HCV replication.
- LF-apoE increases apoAI-HDL production.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Our findings highlight a new interaction between HCV and lipid metabolism, which might be explored for antiviral therapy.
- Our findings represent new opportunity for the development of therapeutic strategies to treat metabolic disorders by increasing HDL production.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma worldwide (1). Novel direct-acting antivirals cure the large majority of infected patients without major side effects. Nevertheless several challenges remain: high costs limit access to therapy, and certain difficult-to-treat patients subgroups may need adjunctive therapeutic approaches (2). Furthermore, vaccine development is hampered by viral evasion of host immune responses and to date, no vaccine is available (3).

HCV almost exclusively infects human hepatocytes and many studies have shown a close link between the HCV life cycle and the hepatic lipid metabolism (4). The hallmark of HCV is its association in the bloodstream of infected patients with the very-low-density lipoproteins (VLDL) or the low-density lipoproteins (LDL) to form an infectious lipoviroparticle (LVP) (5). Apolipoprotein E (apoE), a host factor present at the LVP surface (6), plays a crucial role in HCV attachment and entry (7, 8) as well as assembly and egress (9, 10).

ApoE is a glycoprotein of 299 amino acids involved in the transport, production and uptake of lipoproteins (11). In human, three major isoforms apoE2, apoE3 and apoE4 are mainly produced by hepatocytes, glial cells and macrophages. ApoE3, the wild type form of apoE, differs from apoE2 and apoE4 by one amino acid substitution at position 112 and 158 respectively, dramatically altering their function (11). ApoE2 displays reduced affinity for low-density lipoprotein receptor (LDLR) and is involved in type III hyperlipidemia, whereas apoE4 exhibits a reduced stability and is associated with Alzheimer's disease (11,12).

ApoE is a component of plasma chylomicrons, VLDL, intermediate density lipoproteins (IDL) and high-density lipoproteins (HDL) (13) that mediates their internalization, acting as a ligand for cellular receptors such as LDLR, heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), LDL receptor-related protein 1 (LRP1), and scavenger receptor B1 (SR-B1) (14). While the major part of plasma apoE is associated with lipoproteins, apoE also exists in a lipid-free form (LF) (15-17). The structure of apoE consists of two folded domains, the receptor binding-domain (N-ter) and the lipid-binding domain (C-ter), separated by a hinge region. The physical properties of the C-ter domain allow apoE to reversibly switch between a lipoprotein-associated- and a LF-form, meaning that apoE can be easily exchanged between the different classes of lipoproteins (11). Thus, LF-apoE is

generated by dissociation from apoE-containing lipoproteins but can also be secreted by hepatocytes and macrophages (15-17).

Despite remarkable progress towards understanding apoE function in lipid metabolism, the role of LF-apoE remains poorly understood. Since apoE plays a crucial role in the HCV life cycle, we aimed to decipher the impact of LF-apoE on HCV life cycle.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells lines and primary human hepatocytes. Huh7.5.1 cells were propagated as described (18). Primary human hepatocytes (PHH) were isolated from liver resections with informed consent from all subjects and approval of the Strasbourg University Ethical Committee (Approval# CPP 10-17) as described previously (18). The Huh7 Luc-ubi-neo-ET cells carrying HCV replicon genotype 1b were propagated as described (19). The Huh7.5.1/IRES-Luc stable cell line was obtained by stable transfection of the pIV1122 plasmid under G418 selection (20).

Plasmids and viruses. Plasmids pFK-JFH1, pFK-Jc1, pFK-Luc-Jc1, pFK-Luc-JFH1 and pFK-Luc-JFH1 Δ E1E2 constructs have been described (21-24) (**Fig. S1**). The plasmid pIV1122 was generated by inserting the firefly luciferase reporter gene under the control of the HCV IRES (20).

HCV production and infectivity. Luc-Jc1, Jc1, Luc-JFH1, JFH1 and Luc-JFH1 Δ E1E2 RNA were obtained following T7 *in vitro* transcription. To obtain HCV replicating cells, Huh7.5.1 cells were electroporated with viral RNA as described (9). Three days post-electroporation, HCV replication was assessed by quantification of firefly luciferase activity, or RT-qPCR quantification of viral RNA, as previously described (20, 25). PHH were infected with the JFH1 virus as described (26).

LF-apoE3 treatments. Human recombinant LF-apoE3 lyophilized powder (Sigma-Aldrich[®]) was dissolved to 0.5 mg/ml in 5 mM phosphate buffered saline (PBS; pH 7.8) containing 0.5 mM dithiothreitol to prevent disulfide bridges. LF-apoE3 was diluted at 2, 4 or 6 μ g/mL (final concentration) in fresh medium containing 10% FBS and added to HCV replicating cells. Control cells (CTRL) were treated with LF-apoE3 solvent. Viral replication was determined 48h post-treatment by quantification of luciferase activity or by RT-qPCR. For experiments requiring different serum conditions, HCV replicating cells were washed with PBS and LF-apoE3 was added to fresh medium containing 10%, 2% or

0% of FBS. Viral replication was determined 24h post-treatment. For kinetic experiments, HCV replicating cells were propagated in complete medium including 1% dimethylsulfoxide (DMSO) to slow down the cell proliferation. Cell culture medium was replaced every two days. Luciferase activity was measured every day for 10 days to assess HCV replication (**Fig. 2A**). PHH were infected with JFH1 virus as described (26). Six hours post-infection, cells were washed 3 times with cold PBS + heparin and 2 times with cold PBS. Reference cells were lysed at this step to determine the basal amount of viral RNA (BL = baseline). LF-apoE3 was added to the culture medium at 2, 4 or 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Viral replication was quantified by RT-qPCR 48h post-treatment.

Imaging studies using fluorescent-labeled LF-apoE3. Human recombinant LF-apoE3 was labeled using the Alexa fluor[®]647 Labeling Kit purchased from Life Technologies[™], according to the manufacturer's instructions. HCV replicating cells were treated with LF-apoE3 at 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After 1h at 37°C, cells were gently washed 3 times with PBS and fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% purchased from Electron Microscopy Sciences, for 20 min at RT. Cells were then washed 3 times with PBS, and Fluoroshield[™] supplemented with DAPI (Sigma-Aldrich[®]) was added prior to mounting. Fluorescent imaging was performed using a Leica SP5 II confocal microscope. In parallel, a similar experiment was performed with LF-apoE3 incubated for 1h at 37°C with anti-apoE antibody, before addition to the cell culture medium.

Cholesterol efflux assay. HCV replicating cells were grown in 12 well plates (\approx 80% confluence) and were treated or not with the LXR agonist (T0901317) at 2 μM for 8h at 37°C. Cells were washed 3 times with PBS and incubated in PBS (600 μL) containing LF-apoE3, LF-apoE2 or LF-apoE4 at 2, 4 or 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final concentration). Media were collected 4h post-treatment. Cholesterol amount was measured using the “Amplex[®] Red Cholesterol Assay Kit” purchased from Life Technologies[™], according to the manufacturer's instructions.

Iodixanol density gradient ultracentrifugation. HCV replicating cells (grown in 10% FBS medium or grown in serum-free medium) or PHH (grown in serum-free medium) were treated with LF-apoE3 at 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or PBS (CTRL). Culture media were collected 48h post-treatment. Lipoprotein separation was performed using a flotation iodixanol gradient protocol adapted from Yee *et al.* (27) (see supplementary information)

Statistics. Data sets were analyzed using the Mann-Whitney test. $p < 0.01$ was considered statistically significant. Significant p-values are indicated by asterisks in the individual figures.

RESULTS:

LF-apoE3 specifically impairs HCV replication in a dose-dependent manner

To address the functional impact of LF-apoE on HCV replication, we first defined LF-apoE concentrations used in our cell culture model. In plasma, apoE concentration is in the range of 30 to 80 $\mu\text{g/mL}$, apoE being mainly found in association with lipoproteins (28). ApoE also exists in a LF form at low levels in physiological conditions. It has been shown that LF-apoE concentrations in a range of 2 to 10 $\mu\text{g/mL}$ are sufficient to induce biological effects such as anti-atherosclerotic effects or signaling pathways activation *in vitro* and *in vivo* (17, 29-33). In accordance with these previous findings, we chose to perform our experiments using LF-apoE3 at 2, 4 and 6 $\mu\text{g/mL}$. Importantly, these apoE concentrations did not affect Huh7.5.1 cell proliferation, as verified by MTT cell proliferation assay (**Fig. S2**).

To study the role of LF-apoE on HCV replication, we added LF-apoE3, LF-apoE2 or LF-apoE4 to the culture medium of HCV replicating cells and quantified HCV replication after 48h. As shown in **figure 1A**, increasing amounts of LF-apoE3 resulted in a dose-dependent decrease in viral replication. At a LF-apoE3 concentration of 6 $\mu\text{g/mL}$, an up to 60% inhibition of replication was observed compared to CTRL cells. In contrast, treating HCV replicating cells with increasing amounts of LF-apoE2 or LF-apoE4 did not affect HCV replication (**Fig. 1A**), suggesting that the inhibitory effect is specific of the wild-type form of apoE (LF-apoE3). This observation was confirmed by a decrease in HCV RNA as quantified by RT-qPCR, as well as a decrease in the levels of the Core and NS5A viral proteins (**Fig. 1B**). Of note, a similar inhibition profile was observed when JFH1-infected PHH were treated with increasing amounts of LF-apoE3 (**Fig. 1C**).

Since previous studies have shown that apoE-derived peptides prevent HCV binding to hepatocytes (8, 34), LF-apoE3 could affect HCV by simply inhibiting cell reinfection by newly formed virions. To address this question, we used the Luc-JFH1 Δ E1E2 strain that corresponds to the JFH1 genome lacking the E1 and E2 envelop proteins and that is defective for virus production and cell reinfection (24). The full-length Luc-JFH1 RNA was used in parallel as a control. As shown in **figure 1D**, addition of LF-apoE3 led to a dose-dependent decrease in Luc-JFH1 Δ E1E2 replication similarly to Luc-

JFH1, indicating that LF-apoE3 acts on HCV replication independently of virion production and infection (**Fig. 1D**).

During HCV life cycle, viral replication and translation are closely linked. To further map the step affected by LF-apoE3, we investigated whether LF-apoE3 affects HCV translation. We used a stable cell line expressing a luciferase reporter gene under the control of the HCV internal ribosome entry site (IRES) (Huh7.5.1/IRES-Luc) (20). We observed that LF-apoE3 had no effect on luciferase expression, indicating that LF-apoE3 did not impact HCV IRES-driven translation, but acts on HCV replication (**Fig. 1E**).

To confirm whether these findings are genotype-independent, we investigated the role of LF-apoE3 on a different HCV strain. We used Huh7 cells stably expressing a genotype 1b subgenomic replicon (19). As shown in **Fig. 1F**, LF-apoE3 decreases HCV genotype 1b replication in a dose-dependent manner, similarly to genotype 2a strains.

Finally, in order to evaluate the impact of extended LF-apoE3 treatment on HCV replication, we performed a kinetic experiment by treating HCV replicating cells with LF-apoE3 for 10 days. We observed that LF-apoE3 decreases HCV replication up to 2 logs (for the 6 µg/mL condition) over a 10 days period (**Fig. 2**), confirming the robust effect for persistent infection. Taken together, these data indicate that LF-apoE3 specifically inhibits HCV replication in a genotype-independent manner.

LF-apoE3 impairs HCV replication independently of serum components

Because apoE is an exchangeable apolipoprotein able to dissociate and re-associate with lipoproteins in the bloodstream (28), we investigated whether LF-apoE3's effect on HCV replication was due to a direct effect triggered by LF-apoE3 itself or to an indirect effect through association with a serum component present in the cell culture medium. Therefore, we treated HCV replicating cells for 24h with LF-apoE3, in media containing 10, 2 or 0% FBS. As shown in **figure S3A**, LF-apoE3 decreases HCV replication in a dose-dependent manner, independent of the serum concentration, suggesting that LF-apoE3 acts on HCV replication independently of serum components. Addressing this question using a different approach, we used human purified VLDL and a mix of IDL/LDL to determine whether the inhibition of HCV replication is mediated by LF-apoE3 or also by lipoprotein-associated apoE3. As shown in **figure S3B**, both VLDL and IDL/LDL did not affect HCV replication, suggesting that only LF-apoE3 mediates inhibition of HCV replication.

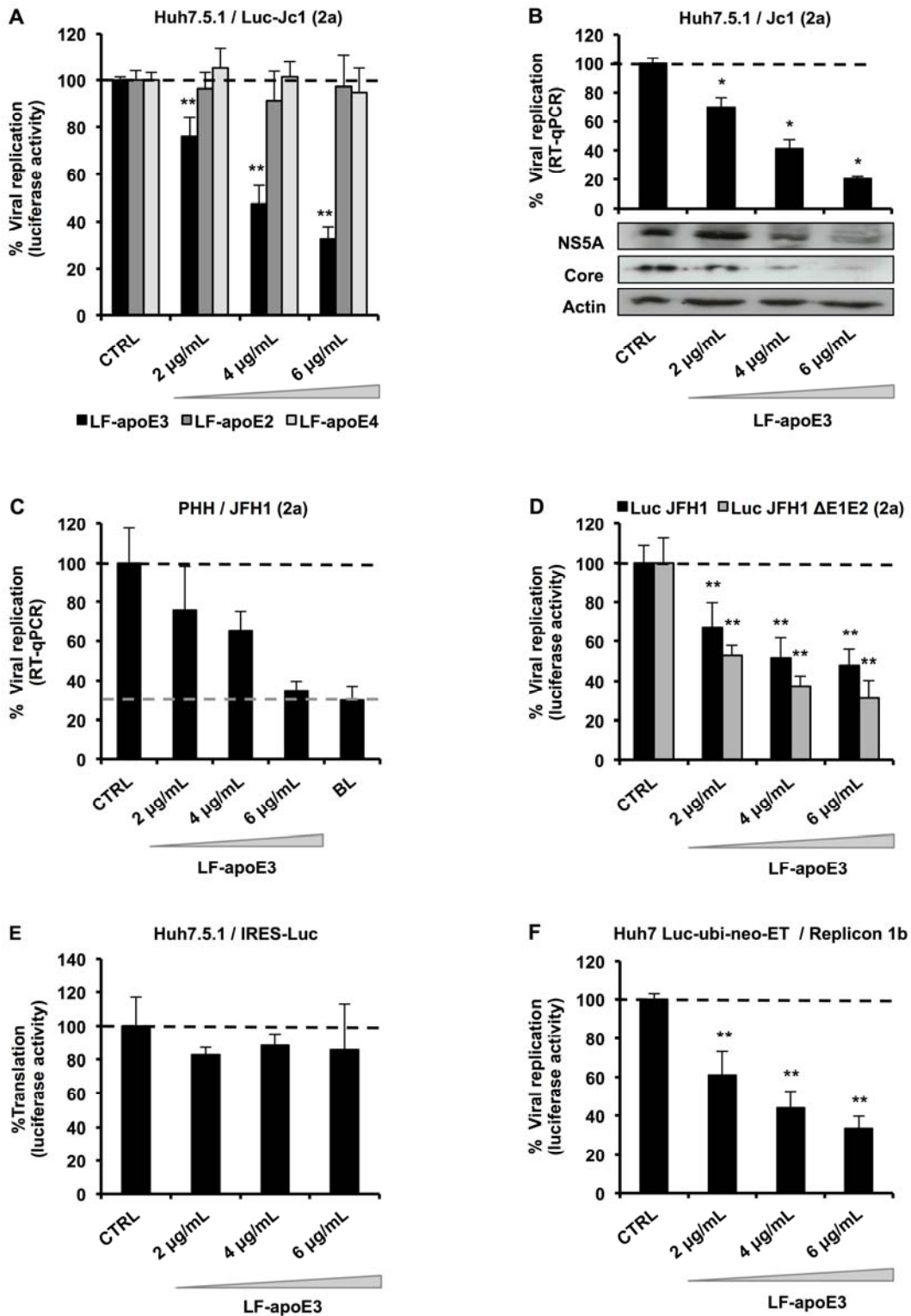


Figure 1. LF-apoE3 specifically impairs HCV replication in a dose-dependent manner
 Addition of LF-apoE3 to the cell culture medium of HCV replicating cells, but not LF-apoE2 and LF-apoE4, leads to a dose-dependent decrease in viral replication. (A) Luc-Jc1 replicating cells were treated with increasing amounts of LF-apoE3, LF-apoE2, or LF-apoE4. Viral replication was determined by quantification of luciferase activity after 48h. (B) Quantification of Jc1 viral RNA levels following LF-apoE3 treatment by RT-qPCR and detection of viral proteins Core and NS5A by WB analysis. (C) LF-apoE3 inhibits JFH1 replication in PHH. JFH1-infected PHH were treated with LF-apoE3 and viral RNA was quantified by RT-qPCR 48h post-treatment. The grey dotted line indicates the basal amount of viral RNA present in

reference PHH at time 0 (BL = baseline) (refer to "Experimental procedures" section). (D) LF-apoE3 does not inhibit HCV replication by affecting cell reinfection. Luc-JFH1ΔE1E2 RNA and Luc-JFH1 replicating cells were treated with LF-apoE3 and viral replication was quantified after 2 days by measuring luciferase activity. (E) LF-apoE3 has no effect on HCV IRES translation. Huh7.5.1/IRES-Luc cells were treated with LF-apoE3 and HCV IRES activity was determined 2 days post-treatment by luciferase activity measurement. (F) LF-apoE3 inhibits HCV genotype 1b replication. Huh7 Luc-ubi-neo-ET cells, which stably express a genotype 1b subgenomic replicon, were treated with LF-apoE3 for 48 h. Replication was determined by measuring luciferase activity. Results are presented as % luciferase activity relative to HCV replicating control cells (CTRL) (100%). Means ± SD from three (A, D-F) or two (B) independent experiments performed in triplicate are shown. For Fig. 1C one representative experiment is presented. *p < 0.01; ** p < 0.001

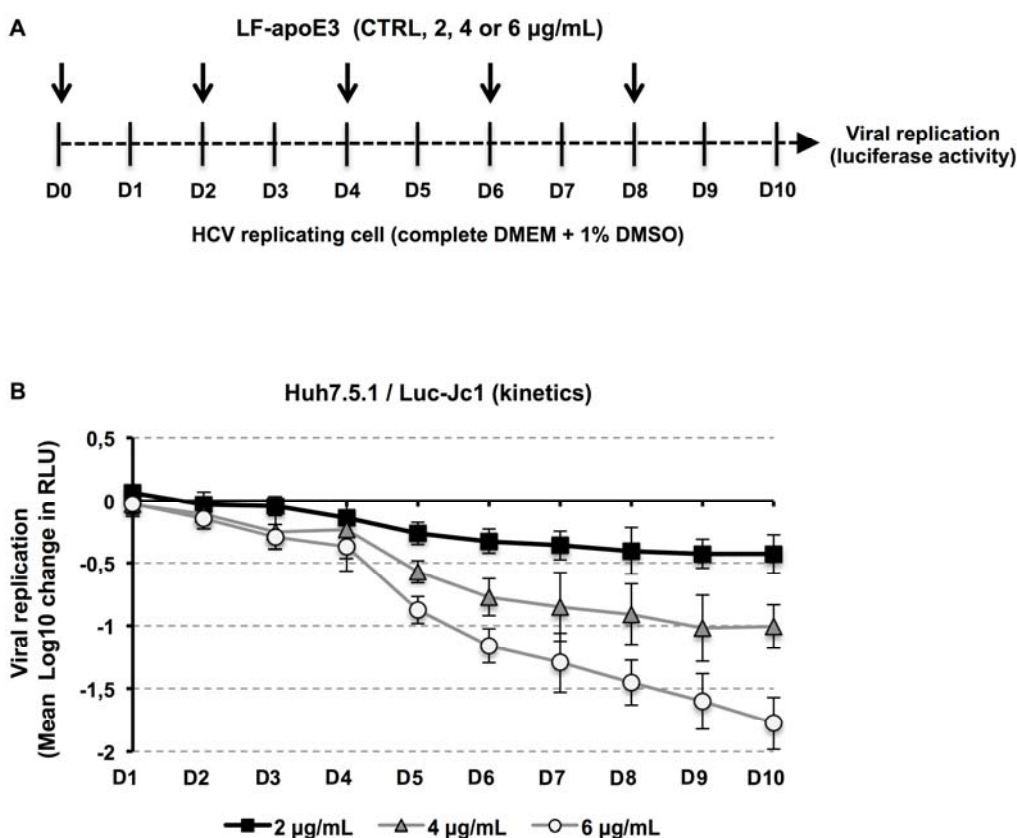


Figure 2. Kinetics of HCV replication after LF-apoE3 treatment for 10 days

(A) Scheme of the experimental procedure. HCV replicating cells were propagated in complete medium added with 1% of DMSO to slow down cell proliferation. Renewal of media and LF-apoE3 treatment were performed every two days as indicated by the arrows (D0, D2, D4; D6 and D8). Every day, HCV replication was quantified by a luciferase assay (D1-D10). (B) HCV replication is expressed as ΔLog_{10} of luciferase activity (RLU) obtained by subtraction of the Log_{10} of RLU (relative light unit) obtained in non-treated control cells (CTRL) and Log_{10} of RLU in LF-apoE3 treated cells for each day. Means ± SD from three independent experiments performed in triplicate are shown.

Classical apoE receptors and apoE recycling process are not involved in the LF-apoE3-induced inhibition of HCV replication

We then investigated the mechanism of action leading to inhibition of HCV replication. To interact with the hepatocyte, apoE binds to several receptors such as LDLR, LRP1, SR-B1, and HSPGs (8, 30, 35). To address a possible role for these receptors, we used RNA interference to modulate the expression levels of LDLR, SR-B1 and LRP1 in hepatic cells. As shown in **Fig. 3A-D**, the silencing of these receptors did not restore HCV replication in LF-apoE3-treated cells. A similar effect was observed after treatment with heparinase III that degrades HSPGs (**Fig. 3E**). To eliminate the effect of receptor compensation (35), we used combinations of siRNAs to simultaneously target LDLR and LRP1 (**Fig. 3F**). Despite efficient silencing, LF-apoE3's inhibition of replication was not affected. Taken together, our data clearly demonstrate that LF-apoE3 acts on HCV replication independently of conventional apoE receptors.

Following apoE-containing lipoprotein endocytosis in hepatocytes, a major part of apoE is recycled while the lipids are metabolized (36). Rab GTPases 5 (Rab5) and (Rab11) are involved in apoE recycling process by regulating early endosome and recycling endosomes trafficking respectively (36-38). To study whether the apoE-recycling process is involved in the observed inhibition of HCV replication, we silenced Rab5 and Rab11 and measured HCV replication following LF-apoE3 treatment. As shown in **figure S4A-B**, silencing of Rab5 and Rab11 did not impair the inhibitory effect of LF-apoE3 on HCV replication. Thus LF-apoE3 inhibits HCV replication by a yet undefined intracellular pathway that is not affected by hampering apoE recycling.

LF-apoE3 requires lipid raft integrity to inhibit HCV replication

To further decipher the mode of action of LF-apoE3 on HCV replication, we investigated whether LF-apoE3 is taken-up by hepatic cells. First, we performed WB employing cells lysates of Huh7.5.1 cells and PHH treated with LF-apoE3. As shown in **Fig. 4A-B**, we observed a dose-dependent accumulation of apoE in treated Huh7.5.1 cells and PHH (**Fig. 4A-B**). To demonstrate that LF-apoE3 is indeed taken-up by the cells, we removed cell surface-bound proteins by washing the LF-apoE3 incubated cells with a cold acid buffer (0.2M glycine buffer + 0.15M NaCl, pH 3.0) prior to perform WB analysis (39). ApoE dose-dependently accumulated in the cells even after acid wash at 37°C, indicating that LF-apoE3 enters hepatic cells and does not remain on the cell surface (**Fig. 4A-B**).

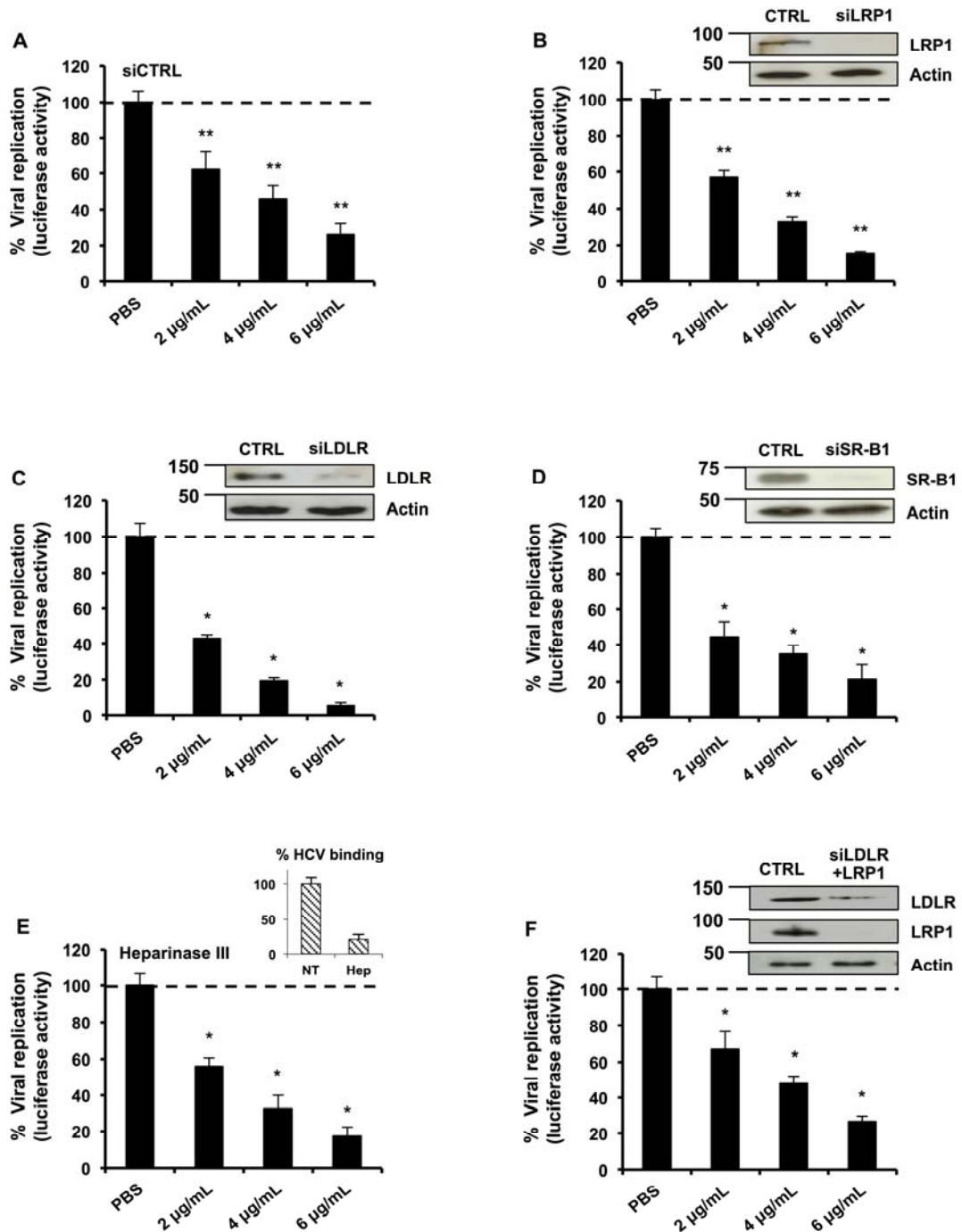


Figure 3. Classical apoE receptors are not involved in the LF-apoE3 induced inhibition of HCV replication. (A-D) Knockdown of classical apoE receptors does not impair LF-apoE3's inhibitory effect on HCV replication. HCV replicating cells were reverse-transfected with a non-targeting siRNA (siCTRL) (A) or siRNAs targeting the different receptors: siLRP1 (B), siLDLR (C) and siSR-B1 (D). Following 48h of silencing, cells were treated with LF-apoE3. Viral replication was determined by luciferase activity 48h post-treatment. Knockdowns were confirmed by WB (B-D). (E) HCV replicating cells were treated with Heparinase III to remove HSPGs (2 UI/mL) for 2h and treated with LF-apoE3. Luciferase activity was measured after 24h. (F) Double knockdown of LDLR and LRP1 does not impair LF-apoE3's inhibitory effect on HCV replication. LDLR and LRP1 were simultaneously knocked-down using the same experimental strategy employed in (A-D). Results are presented as % luciferase activity relative to silenced HCV-replicating cells treated with PBS (PBS, set at 100%). Means \pm SD from two independent experiments performed in triplicate are shown. Means \pm SD from three independent experiments performed in triplicate are shown. . *p < 0.01; ** p < 0.001

To further confirm LF-apoE uptake, we traced fluorescent-labeled LF-apoE3 by confocal microscopy and observed that LF-apoE3 indeed enters into Huh7.5.1 cells (**Fig. 4C**). Moreover, pre-incubation of LF-apoE3 with anti-apoE antibodies blocked LF-apoE3 entry (**Fig. 4C**). Furthermore, we observed that the inhibition of HCV replication was lost by blocking LF-apoE3 entry with an apoE-antibody (**Fig. 4D**). These data indicate that on one hand LF-apoE3 uptake is an essential requirement for efficient inhibition of HCV replication and on the other hand that the effect on HCV replication is LF-apoE3-specific.

To investigate the potential pathways of LF-apoE3 entry, we treated cells with CPZ, an inhibitor of clathrin-mediated endocytosis, or FPN, an inhibitor of lipid raft mobility, and followed both LF-apoE3 entry and its impact on HCV replication (**Fig. 4E-G**). As shown in **Fig. 4E**, LF-apoE3 entry was strongly impaired in FPN-treated cells, compared with non-treated cells (NT) suggesting that apoE uptake is mainly lipid-raft dependent. This result was confirmed by intracellular apoE quantification using an ELISA assay (**Fig. 4F**). Moreover lipid-raft dependent entry of LF-apoE3 is mainly required for LF-apoE3-mediated inhibition of HCV replication (**Fig. 4G**). In our experimental conditions, CPZ treatment also inhibits LF-apoE3 entry but to a lesser extent compared to FPN treatment. This effect could be due to association of a small part of LF-apoE3 with lipoproteins produced by the cells (**Fig. 4F-G**). Collectively, these data suggest, that both lipid raft- and clathrin-dependent pathways may contribute to cell entry of LF-apoE3. However, given the magnitude of pharmacological inhibition, it is likely that lipid-raft dependent entry is more relevant for LF-apoE3-mediated inhibition of HCV replication.

LF-apoE3 induces an ABCG1-dependent cholesterol efflux

In 2003, Shi *et al.* demonstrated that HCV replication occurs in close proximity to lipid rafts, consisting of cholesterol-enriched microdomains (40). Thus, depletion of cellular cholesterol might dramatically impair HCV replication (41). Since apoE plays a key role in the hepatic lipid metabolism (11-17), we hypothesized that the inhibition of HCV replication might occur through cholesterol depletion. To address this point, we quantified extracellular cholesterol released from hepatic cells treated with LF-apoE3. Furthermore, we compared the effect of LF-apoE3 with LF-apoE2 and LF-apoE4 on cholesterol release. As shown in **Fig. 5A** we observed a dose-dependent increase of extracellular cholesterol after LF-apoE3 treatment, suggesting a LF-apoE3 dependent cholesterol efflux from hepatic cells. In contrast, LF-apoE2 and apoE4 only induced a modest increase of cholesterol efflux.

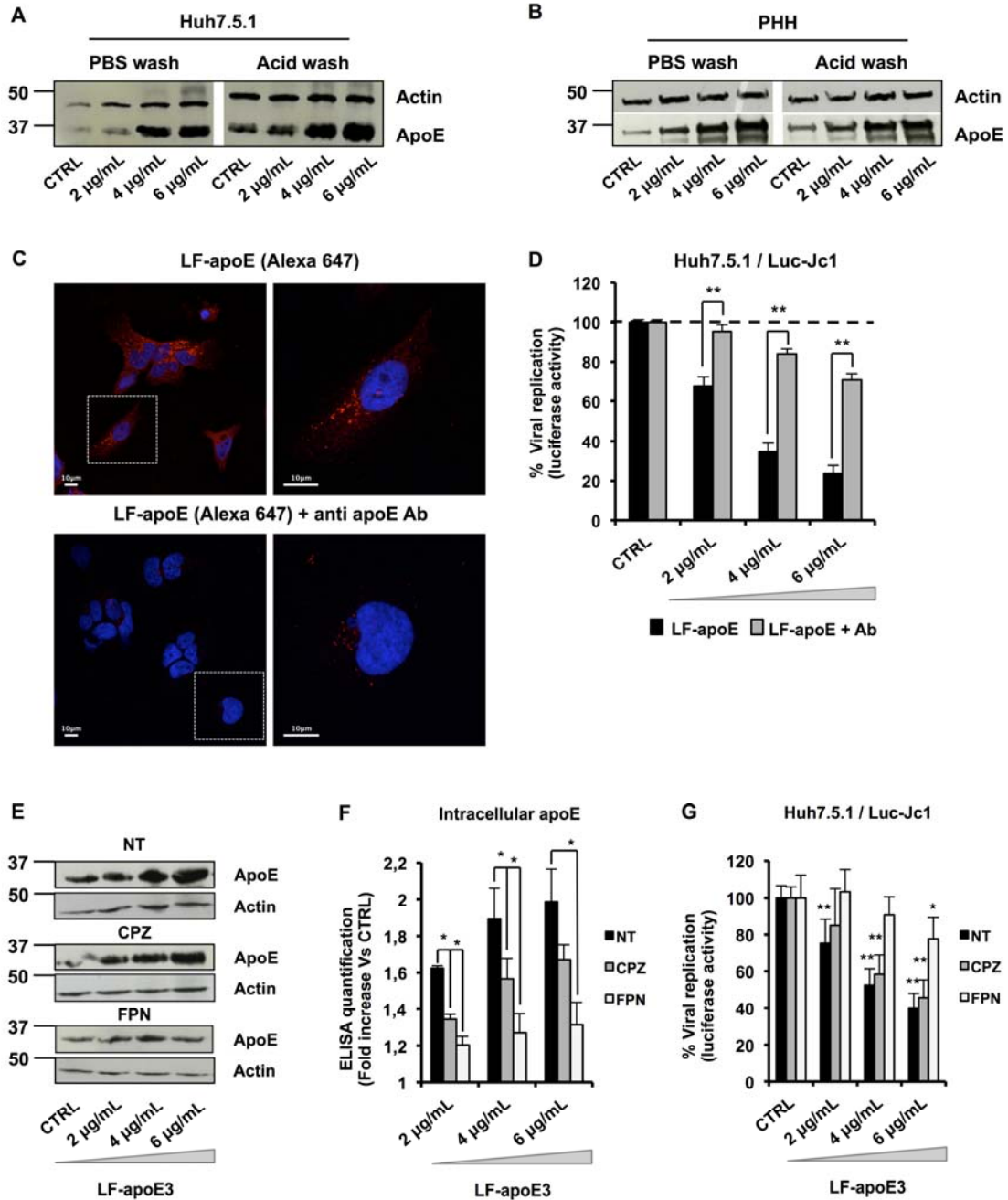


Figure 4. LF-apoE3 requires lipid raft integrity to inhibit HCV replication

(A-B) Exogenous LF-apoE3 accumulates in hepatic cells. Huh7.5.1 cells (A) or PHH (B) treated with increasing amounts of LF-apoE3 for 1h at 37°C. Cells were then washed 3 times with cold PBS or cold acid buffer (0.2M glycine buffer + 0.15M NaCl, pH 3.0). WB analysis was performed on cell lysates to detect LF-apoE3 uptake. (C) Exogenous LF-apoE3 labeled with Alexa Fluor® 647 is taken-up by Huh7.5.1 cells. Labeled LF-apoE3 alone or pre-mixed with anti-apoE antibody during 1 h were added to HCV replicating cells for 1h at 37°C. Cells were then fixed in PFA 4% during 20 min at RT and analyzed by fluorescence using Leica SP5 II confocal microscope. DAPI-labeled nuclei are shown in blue. (D) HCV replication was quantified 48h post-treatment with LF-apoE3 or LF-apoE3 plus antibody (Ab). Results are expressed as % luciferase activity relative to CTRL HCV replicating cells (100%). Means ±SEM from for independent experiments done in triplicate are shown. (E-G) Disruption of lipid raft integrity abolishes LF-apoE3 uptake by hepatocytes. (E) HCV replicating cells were treated with CPZ (5 µg/mL) or FPN (5 µg/mL) for 1h before LF-apoE3 treatment. After 1h, cells were lysed and WB analysis (E) or ELISA assay (F) was performed to visualize apoE

accumulation in cells. Results are expressed as fold increase of apoE in treated cells, compared to non-treated cells (NT). Means \pm SD from three independent experiments done in duplicate are shown. (G) In parallel, HCV replication was quantified by measuring luciferase activity 24 h post-treatment. To facilitate the comparison between the different conditions, the control of each condition (CTRL cells) was set at 100% and the results are presented as a % luciferase activity relative to this control. Means \pm SD from three independent experiments done in triplicate are shown. . * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$

In hepatocytes, ATP binding cassettes subfamily A member 1 (ABCA1) and subfamily G member 1 (ABCG1) mainly drive cholesterol efflux. Their function is to transfer intracellular cholesterol to an extracellular acceptor. While ABCA1 is specialized in loading cholesterol on LF-apoAI to form pre-HDL, ABCG1 transfers cholesterol directly to HDL (42). We addressed a possible role for ABCA1 and ABCG1 in LF-apoE3 mediated inhibition of HCV replication. HCV replication was measured in ABCA1- or ABCG1-silenced cells after LF-apoE3 treatment. We observed that, despite efficient silencing of ABCA1, LF-apoE3 inhibited HCV replication (**Fig. 5B**). In contrast, the silencing of ABCG1 abolished the inhibitory effect of LF-apoE3 on HCV replication (**Fig. 5C**). These results suggest that LF-apoE3 induces an ABCG1-dependent cholesterol efflux resulting in inhibition of HCV replication. To confirm this hypothesis, we performed a cholesterol efflux assay on ABCG1 silenced cells treated with LF-apoE3 (**Fig. 5D**). Silencing efficacy was assed by RT-qPCR (**Fig. S5A**). As observed in **Fig. 5D**, silencing of ABCG1 markedly reduces the LF-apoE3 dependent cholesterol efflux. To further confirm the role of ABCG1, we increased ABCG1 expression in HCV replicating cells (**Fig. 5E**) and Huh7.5.1 cells (**Fig. 5F**) using a LXR agonist (T0901317) and treated the cells with LF-apoE3. Drug efficacy was confirmed by measurement of ABCG1 mRNA using RT-qPCR (**Fig. S5B**). We observed that the increase of ABCG1 expression markedly improved the inhibitory effect of LF-apoE3 on HCV replication (**Fig. 5E**). Moreover, this result correlates with a strong increase in LF-apoE3 dependent cholesterol efflux (**Fig. 5F**). Taken together these results demonstrate that LF-apoE3 inhibits HCV replication through an ABCG1-dependent cholesterol efflux.

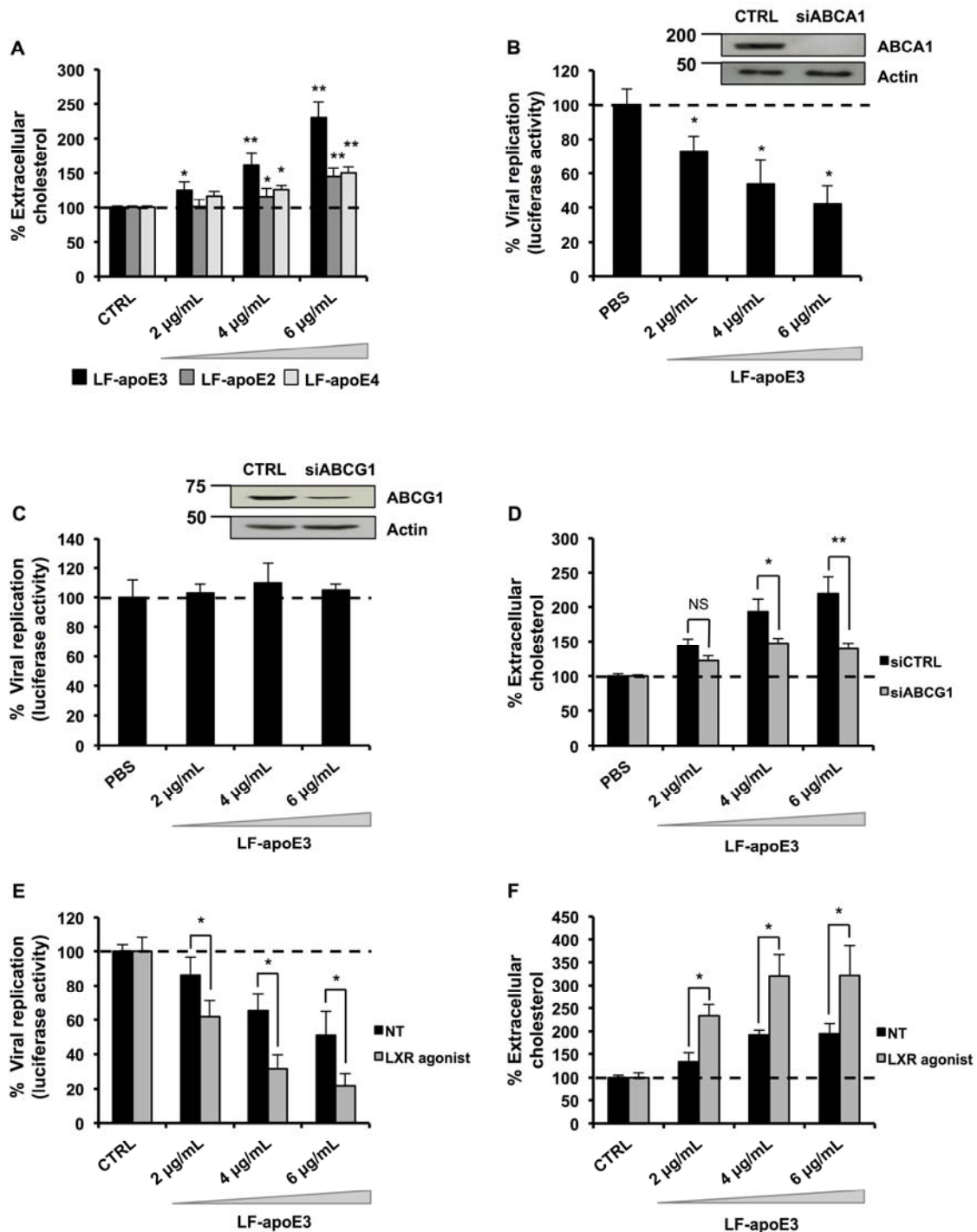


Figure 5. LF-apoE3 induces an ABCG1-dependent cholesterol efflux that inhibits HCV replication. (A) LF-apoE3, but not LF-apoE2 and LF-apoE4 induces a marked cholesterol efflux from Huh7.5.1 cells. Cholesterol efflux assay was performed as described in Material and Methods section using LF-apoE3, LF-apoE2, and LF-apoE4. Means \pm SEM from two independent experiments done in triplicate are shown. (B) Knockdown of ABCG1 but not ABCA1 alleviates the inhibitory effect of LF-apoE3 on HCV replicating cells. Two days after ABCA1 (B) or ABCG1 (C) silencing, cells were treated with LF-apoE3 and viral replication was assessed 48 h post-treatment by luciferase activity quantification. Results are expressed as a % luciferase activity relative to silenced non-treated HCV replicating cells (set at 100%). Means \pm SD from three independent experiments done in triplicate are shown. (D) LF-apoE3 induces an ABCG1-dependent cholesterol efflux. Cholesterol efflux assay was performed using LF-apoE3 in cells transfected with siRNA targeting ABCG1 or siCTRL. Means \pm SEM from five independent experiments done in triplicate are shown. (E-F) An increase in ABCG1

expression improves both LF-apoE3 inhibitory effects on HCV replication and LF-apoE3 dependent cholesterol efflux. HCV replicating cells (E) or Huh7.5.1 cells (F) were treated with the LXR agonist T0901317, at 2 μ M for 8h, to increase ABCG1 expression. (E) HCV replicating cells were treated with LF-apoE3 and HCV replication was quantified by luciferase activity measurement. Means \pm SD from three independent experiments done in triplicate are shown. (F) Cholesterol efflux assay was performed on Huh7.5.1 or Huh7.5.1 cells treated with LXR agonist. Means \pm SEM from two independent experiments done in triplicate are shown. . *p < 0.01; ** p < 0.001

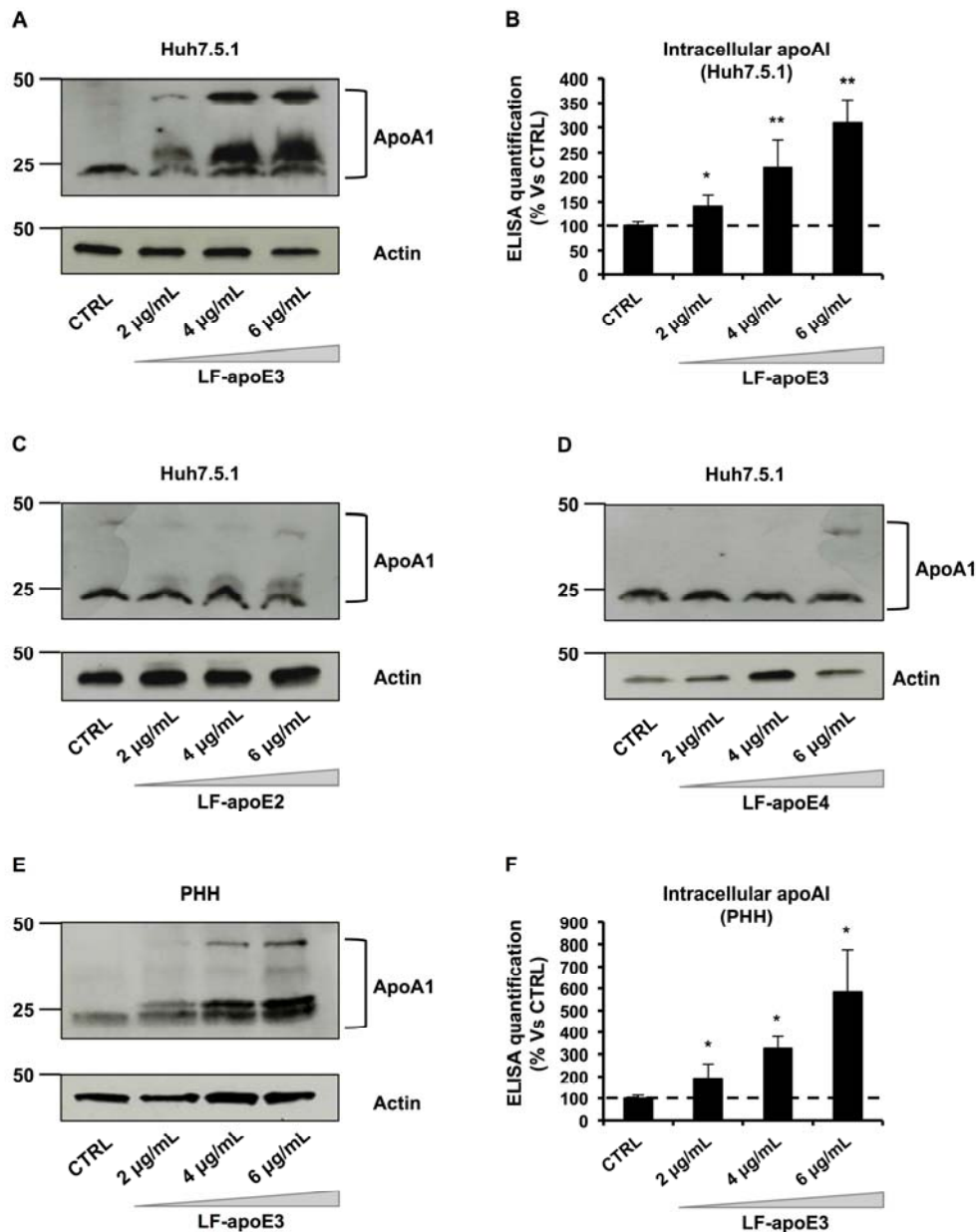


Figure 6. LF-apoE3 induces an increase of apoA1 production in hepatic cells.

Huh7.5.1 cells were treated with increasing amounts of LF-apoE3 (A-B), LF-apoE2 (C) and LF-apoE4 (D) and PHH were treated with LF-apoE3 (E-F). After 48h, WB were performed to detected apoA1 protein level (A, C, D, E). In parallel, intracellular apoA1 was quantified after LF-apoE3 treatment in Huh 7.5.1 (B) and PHH (F) using an ELISA assay. Means \pm SD from four independent experiments done in triplicate are shown. . *p < 0.01; ** p < 0.001

LF-apoE3 induces an increase in apoAI-HDL production

ABCG1 is known to load cholesterol on HDL (42). Since HDL production mainly depends on apoAI synthesis, we wondered whether LF-apoE3 influences the expression level of apoAI in order to favor HDL synthesis. Therefore, we monitored the levels of intracellular apoAI following LF-apoE3 treatment by WB (**Fig. 6A**) and ELISA assay (**Fig. 6B**) in Huh7.5.1 cells. We observed that the intracellular apoAI level markedly increased in a dose-dependent manner under LF-apoE3 treatment (**Fig. 6A-B**). In contrast, LF-apoE2 and LF-apoE4 treatment did not affect the apoAI protein level, suggesting that the increase of apoAI expression is LF-apoE3 specific (**Fig. 6C-D**). Of note, we confirmed that LF-apoE3 increases apoAI expression in PHH (**Fig. 6E**).

To demonstrate that LF-apoE3 increases apoAI-HDL production, we performed a flotation iodixanol gradient to separate the lipoproteins produced in cell culture supernatant of CTRL- or Huh7.5.1- cells treated with LF-apoE3 (27) (**Fig. 7A**). Using WB analysis of the fractions harvested, we confirmed that the apoAI protein level was strongly increased in cell supernatants of LF-apoE3 treated cells, compared to CTRL cells (**Fig. 7A**, upper panels). Moreover, the apoAI increase was observed in the heavy density fractions (1 to 7) corresponding to the HDL (**Fig. 7A-C**, upper panels). These results indicate that LF-apoE3 increases apoAI-HDL production. A similar profile was obtained for Huh7.5.1 cells grown in serum-free conditions and for PHH (**Fig. 7B-C**). These data confirm that LF-apoE3 increases apoAI-HDL production in hepatic cells regardless of the presence of serum.

Finally, we studied the presence of apoE in the different fractions by WB analysis. First, we observed an increase of the apoE protein level in the lowest density fractions (15 to 21) after LF-apoE3 treatment, suggesting that a part of LF-apoE3 associates with VLDL (**Fig.7A**, bottom panels). The same profile was obtained using serum-free conditions and PHH (**Fig. 7B-C**, bottom panels), suggest that LF-apoE3 associates with VLDL produced *de novo* by the hepatic cells. Secondly, we observed an increase of the apoE protein level in the highest density (1 to 7) after LF-apoE3 treatment (**Fig.7A-C**). This corresponds to the exogenous LF-apoE3 protein since the LF-apoE protein, non-associated with lipoproteins, cannot migrate in the gradients. Nevertheless, we cannot exclude an association of LF-apoE3 with the apoAI-HDL produced by the cells. Taken together, our data show that LF-apoE3 promotes apoAI-HDL formation, which in turn becomes available for cholesterol loading by ABCG1 (see cartoon **Fig. 8**). This mechanism is responsible for the observed inhibition of HCV replication as a consequence of cellular cholesterol depletion.

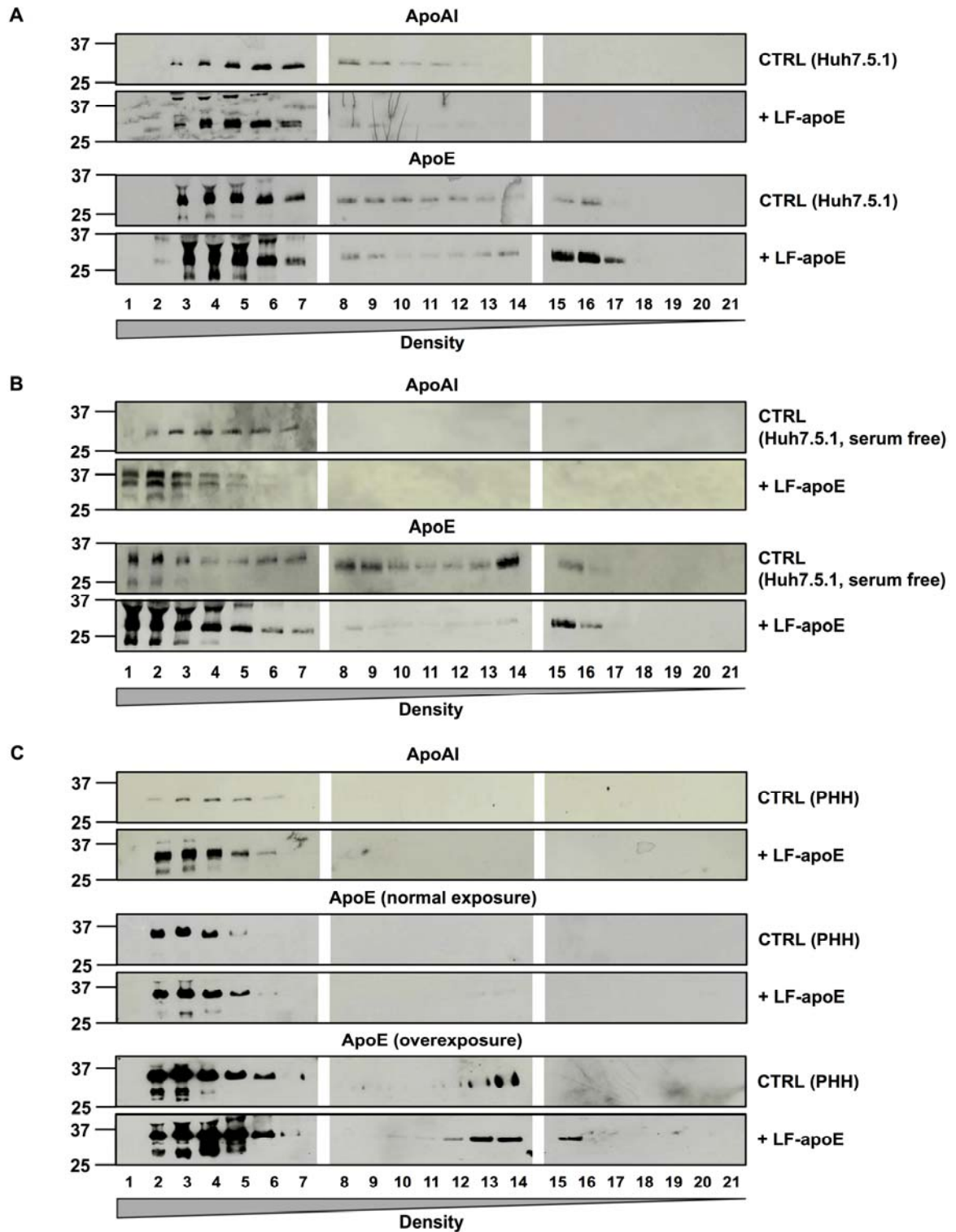


Figure 7. LF-apoE3 induces an increase of apoAI-HDL production

Huh7.5.1 cells grown in complete medium (A), or in serum-free medium (B), and PHH (C) were treated with LF-apoE3 (6 µg/mL). After 2 days, cell culture supernatants were harvested. The different lipoproteins were separated by iodixanol gradient and ultracentrifugation. Twenty-one fractions were harvested and apoAI and apoE protein levels were detected by WB analysis in each fraction. For PHH, apoE in the lowest density fractions was detected after a long exposure (C).

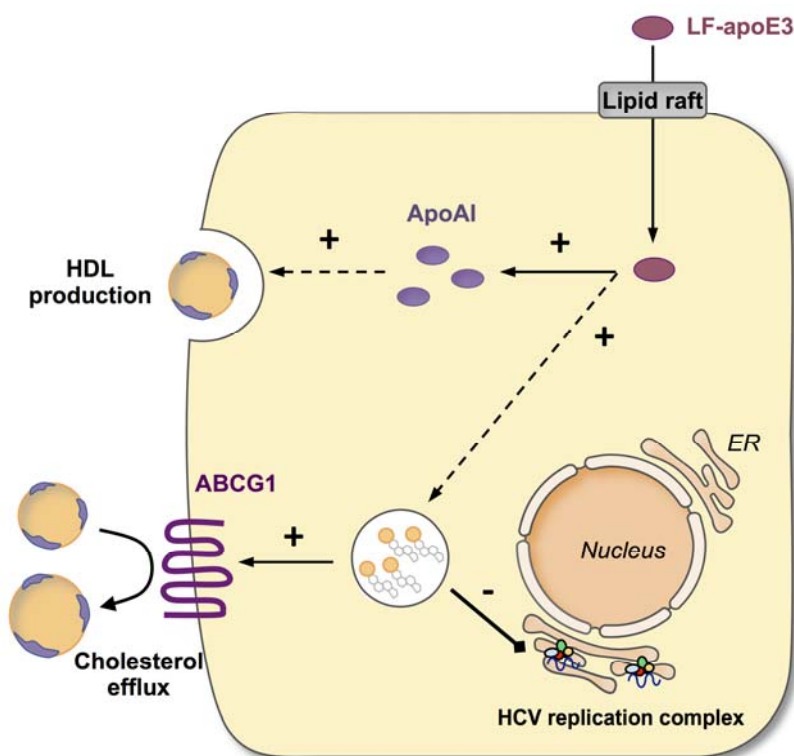


Figure 8: LF-apoE3 inhibits HCV replication by inducing an ABCG1-dependent cholesterol efflux and increasing apoAI-HDL production

In the proposed model, LF-apoE3 enters hepatocytes by interacting with a yet undefined receptor, *via* a lipid-raft dependent pathway. Following entry, LF-apoE3 induces an increase of apoAI-HDL production and secretion, which in turn becomes available for cholesterol loading by ABCG1. This cholesterol efflux is responsible for the observed inhibition of HCV replication.

DISCUSSION

Using the HCVcc model, we report here for the first time that LF-apoE3 specifically inhibits HCV replication through its regulatory role in hepatic lipid metabolism. This study highlights a new function for apoE and points out the importance of LF-apoE-hepatocyte interactions to induce a host cell-mediated response affecting viral replication, as a consequence of a modification of the lipid metabolism homeostasis. We demonstrate that LF-apoE3 acts on HCV replication independently of the classical apoE receptors, hinting at the existence of a yet unidentified apoE-receptor at the hepatocyte surface able to induce a new signaling pathway. Several studies have already proposed the presence of such a receptor, by demonstrating that LF-apoE3 induces antimitogenic effects in smooth muscle cells and inhibits LTCD4⁺ and LTCD8⁺ proliferation *via* a receptor distinct from the conventional lipoprotein receptors (36, 43).

In line with other studies (31, 44-48) we showed that LF-apoE3 induces cholesterol efflux from hepatocytes. Moreover, we highlighted for the first time a functional role of ABCG1 in apoE-mediated cholesterol efflux. Since ABCG1 promotes cholesterol efflux on HDL (42), and LF-apoE does not directly interact with ABCG1 (49) our data suggest that LF-apoE3 acts on HDL metabolism. We demonstrated that LF-apoE3 increases apoAI-HDL production and secretion in hepatic cells. ABCA1 and ABCG1 often work together to form HDL (42). Several studies have shown that apoE can induce ABCA1-dependent cholesterol efflux (47, 48). However in our hands, ABCA1 was not involved in LF-apoE3 inhibition of HCV replication. Consistent with this observation, Kiss *et al.* demonstrated that lipidation of apoAI leading to HDL formation occurs by both ABCA1-dependent and independent pathways (50). In 2006, Wang *et al.*, demonstrated that ABCG1 can induce movement of cholesterol from endoplasmic reticulum (ER) to the plasma membrane to promote cholesterol efflux to an extracellular acceptor (51). We thus propose that LF-apoE3 inhibits HCV replication by mobilizing cholesterol from ER *via* ABCG1.

Taken together, our data suggest that LF-apoE3 increases premature apoAI-HDL production by a yet undefined mechanism, which in turn leads to an ABCG1-dependent cholesterol efflux in order to form more mature HDL. This model correlates with an *in vivo* study showing that apoE reduces atherosclerosis by increasing plasma apoAI-HDL in mice (52). In addition Zhang and collaborators showed that apoE induces cholesterol efflux without supplementary addition of extracellular cholesterol acceptors (53), supporting the fact that LF-apoE3 induces extracellular acceptors production such as HDL.

Such mechanisms are likely to serve as feedback regulatory loops in a physiological context. We can conceive that after intense formation of VLDL and LDL, extracellular LF-apoE3 would induce cholesterol efflux to prevent hepatotoxic accumulation of cholesterol.

In regard to HCV infection, the LF-apoE3-induced inhibition of replication might appear paradoxical. Indeed, endogenous apoE has been shown to act at multiple steps of the HCV life cycle (7-10). However in this study LF-apoE3 is added to the cell culture medium and is thus not included in the pool of endogenous apoE. One explanation could be that HCV might take advantage of the increase in LF-apoE3 concentration in the extracellular environment, as a consequence of high levels of VLDL-associated virion production, to fine-tune its level of replication and thus establish chronicity. Disturbing this balance may present possible means to contain HCV infection.

Collectively, our findings highlight a new mechanism in lipid metabolism regulation but also new interrelationships between mediators of the lipid metabolism and the HCV life cycle. These findings are important for a better understanding of viral pathogenesis and might be explored for antiviral therapy. Moreover, such a mechanism may also represent an opportunity for the development of therapeutic strategies to treat metabolic disorders, such as hyperlipidemia or atherosclerosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge Dr F. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for the Huh7.5.1 cells, Dr T. Wakita (Dept of Virology II, National Institutes of Health, Tokyo, Japan), Dr. C. M. Rice (Rockefeller University, NY) for providing the HCV strain JFH1, Dr. R. Bartenschlager (Institut for Virologie, Heidelberg, Germany) for HCV recombinant Jc1, Dr. M. Harris (University of Leeds, UK) for the sheep polyclonal anti-NS5A antibody and Dr. V. Lohmann (Institut for Virologie, Heidelberg, Germany) for the subgenomic replicon system, genotype 1b. We acknowledge M. Parnot (Inserm U1110, Strasbourg, France) for excellent technical assistance, Prof. P. Pessaux (Inserm U1110, Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépatodigestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France) for providing liver resections for isolation of PHH as well as S. Durand and L. Heydmann (Inserm U1110, Strasbourg, France) for PHH isolation. We acknowledge Drs M. B. Zeisel, O. Koutsopoulos and L. Mailly (Inserm U1110, Strasbourg, France) for critical reading of the manuscript. We also would like to thank Dr. S. Chasserot for the confocal microscopy analysis (INCI UPR3212, CNRS, Strasbourg, France), Dr. S. Pfeffer and Dr. Franck Martin (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR 9002, CNRS Strasbourg France) and Dr. Jean-Christophe Ame (Institut de Recherche de l'École de Biotechnologie de Strasbourg, UMR7242, CNRS, Strasbourg, France) for setting up experimental procedures.

COMPETING PERSONAL AND FINANCIAL INTERESTS

The authors have no conflicting interests to disclose.

FINANCIAL SUPPORT

This work has been published under the framework of the LABEX HepSYS [ANR-10-LABX-0028] and benefits from funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the Investments for the future program. E. C. and M. L. were

supported by a fellowship of the French Ministry for Research and Education (MESR). T.F. Baumert acknowledges funding by the European Union (ERC-AdG-2014 HEPCIR, EU2020 HEPCAR, EU-Interreg IV-Rhin Supérieur-FEDER-Hepato-Regio-Net) and ARC-IHU (TheraHCC program). C. Schuster acknowledges funding by the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) (2010-307/2011-415) and the Initiative d'excellence (IdEx) program from the University of Strasbourg.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EC, CS, EV and TB wrote the manuscript. EC, CS, and ML designed experiments. EC and MO performed experiments. EC and CS analyzed the data. CS initiated and directed the project.

LIST OF ABBREVIATIONS

HCV, hepatitis C virus; VLDL, very-low-density lipoproteins; LDL, low-density lipoproteins; LVP, lipoviroparticle; apoE, apolipoprotein E; LDLR, low-density lipoprotein receptor; IDL, intermediate density lipoproteins; HDL, high density lipoprotein; HSPGs, heparan sulfate proteoglycans; LRP1, low-density lipoprotein receptor-related protein 1; SR-B1, scavenger receptor class B type 1; apoAI, apolipoprotein AI; LF, lipid-free; FBS, fetal bovine serum; PHH, primary human hepatocyte; JFH1, Japanese fulminant hepatitis 1; Jc1, J6-JFH1 chimera; Luc-Jc1, Jc1 with luciferase reporter; CPZ, chlorpromazine; FPN, filipin; LXR, liver X receptor; siRNA, small interfering RNA; WB, western blot; CTRL, control; DMSO, dimethylsulfoxide; BL, baseline; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PFA, paraformaldehyde; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; IRES, internal ribosome entry site; TRL, triglyceride rich lipoprotein; NT, non-treated; ABCA1, ATP binding cassette sub-family A member 1 protein; ABCG1, ATP binding cassette sub-family G member 1 protein; HCVcc, cell culture derived hepatitis C virus; ER, endoplasmic reticulum; RLU, relative light unit; EMCV, encephalomyocarditis virus.

REFERENCES

1. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2007;13:2436–2441.
2. Chung RT, Baumert TF. Curing Chronic Hepatitis C — The Arc of a Medical Triumph. *New England Journal of Medicine.* 2014;370:1576–1578. doi:10.1056/NEJMp1400986
3. Baumert TF, Fauvelle C, Chen DY, *et al.* A prophylactic hepatitis C virus vaccine: a distant peak still worth climbing. *J. Hepatol.* 2014;61:S34–44. doi:10.1016/j.jhep.2014.09.009
4. Felmler DJ, Hafirassou ML, Lefevre M, *et al.* Hepatitis C Virus, Cholesterol and Lipoproteins — Impact for the Viral Life Cycle and Pathogenesis of Liver Disease. *Viruses.* 2013;5:1292–1324. doi:10.3390/v5051292
5. André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, *et al.*, Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *J. Virol.* 2002;76:6919–6928. doi:10.1128/JVI.76.14.6919-6928.2002
6. **Merz A, Long G**, Hiet M-S, *et al.* Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J. Biol. Chem.* 2011;286:3018–3032. doi:10.1074/jbc.M110.175018
7. **Chang K-S, Jiang J, Cai Z**, *et al.* Human Apolipoprotein E Is Required for Infectivity and Production of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *J. Virol.* 2007;81:13783–13793. doi:10.1128/JVI.01091-07
8. **Jiang J, Cun W**, Wu X, *et al.* Hepatitis C Virus Attachment Mediated by Apolipoprotein E Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. *J Virol.* 2012;86:7256–7267. doi:10.1128/JVI.07222-11
9. **Benga WJA, Krieger SE, Dimitrova M**, *et al.* Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology.* 2010;51:43–53. doi:10.1002/hep.23278
10. Lee J-Y, Acosta EG, Stoeck IK, *et al.* Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins. *J. Virol.* 2014;88:12422–12437. doi:10.1128/JVI.01660-14
11. Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in Biochemical Sciences.* 2006;31:445–454. doi:10.1016/j.tibs.2006.06.008
12. Jofre-Monseny L, Minihane A-M, Rimbach G. Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52:131–145. doi:10.1002/mnfr.200700322

13. Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J. Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S156–161. doi:10.1194/jlr.R800058-JLR200
14. Mahley RW, Rall SC. APOLIPOPROTEIN E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annual Review of Genomics and Human Genetics.* 2000;1:507–537. doi:10.1146/annurev.genom.1.1.507
15. Oram JF, Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J. Lipid Res.* 1996;37:2473–2491.
16. Tokuda T, Calero M, Matsubara E, *et al.* Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer’s amyloid beta peptides. *Biochem J.* 2000;348:359–365.
17. Okoro EU, Zhao Y, Guo Z, *et al.* Apolipoprotein E4 Is Deficient in Inducing Macrophage ABCA1 Expression and Stimulating the Sp1 Signaling Pathway. *PLoS ONE.* 2012;7:e44430. doi:10.1371/journal.pone.0044430
18. Krieger SE, Zeisel MB, Davis C, *et al.* Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2–CD81–Claudin-1 associations. *Hepatology.* 2010;51:1144–1157. doi:10.1002/hep.23445
19. Frese M, Barth K, Kaul A, *et al.* Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor-alpha. *J Gen Virol* 2003;84:1253–9. doi:10.1099/vir.0.18997-0
20. Majzoub K, Hafirassou ML, Meignin C, *et al.* RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell* 2014;159:1086–95. doi:10.1016/j.cell.2014.10.041
21. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, *et al.* Characterization of the Early Steps of Hepatitis C Virus Infection by Using Luciferase Reporter Viruses. *J Virol.* 2006;80:5308–5320. doi:10.1128/JVI.02460-05
22. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, *et al.* Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:7408–7413. doi:10.1073/pnas.0504877103
23. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, *et al.* Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology.* 2007;46:1722–1731. doi:10.1002/hep.21994
24. **Wakita T, Pietschmann T, Kato T, *et al.*** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 2005;11:791–796. doi:10.1038/nm1268
25. Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, *et al.* Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* 1999;116:636-642.

26. **Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, et al.** EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* 2011;17:589–595. doi:10.1038/nm.2341
27. Yee MS, Pavitt DV, Tan T, et al. Lipoprotein separation in a novel iodixanol density gradient, for composition, density, and phenotype analysis. *J. Lipid. Res.* 2008;49:1364–71. doi:10.1194/jlr.D700044-JLR200
28. Sundaram M, Yao Z. Intrahepatic Role of Exchangeable Apolipoproteins in Lipoprotein Assembly and Secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:1073–1078. doi:10.1161/ATVBAHA.111.241455
29. Huang ZH, Lin C-Y, Oram JF, et al. Sterol Efflux Mediated by Endogenous Macrophage ApoE Expression Is Independent of ABCA1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:2019–2025. doi:10.1161/hq1201.100242
30. Bultel-Brienne S, Lestavel S, Pilon A, et al. Lipid Free Apolipoprotein E Binds to the Class B Type I Scavenger Receptor I (SR-BI) and Enhances Cholesteryl Ester Uptake from Lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 2002;277:36092–36099. doi:10.1074/jbc.M201943200
31. **Zhao Y, Chen X, Yang H, et al.** A Novel Function of Apolipoprotein E: Upregulation of ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression. *PLoS ONE.* 2011;6:e21453. doi:10.1371/journal.pone.0021453
32. Hasty AH, Linton MF, Swift LL, et al. Determination of the lower threshold of apolipoprotein E resulting in remnant lipoprotein clearance. *J Lipid Res* 1999;40:1529–38.
33. Thorngate FE, Rudel LL, Walzem RL, et al. Low levels of extrahepatic nonmacrophage ApoE inhibit atherosclerosis without correcting hypercholesterolemia in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1939–45.
34. Liu S, McCormick KD, Zhao W, et al. Human apolipoprotein E peptides inhibit hepatitis C virus entry by blocking virus binding. *Hepatology.* 2012;56:484–491. doi:10.1002/hep.25665
35. Foley EM, Esko JD. Hepatic heparan sulfate proteoglycans and endocytic clearance of triglyceride-rich lipoproteins. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2010;93:213–233. doi:10.1016/S1877-1173(10)93010-X
36. Heeren J, Beisiegel U, Grewal T. Apolipoprotein E Recycling Implications for Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:442–448. doi:10.1161/01.ATV.0000201282.64751.47
37. Braun NA, Mohler PJ, Weisgraber KH, et al. Intracellular trafficking of recycling apolipoprotein E in Chinese hamster ovary cells. *J. Lipid Res.* 2006;47:1176–1186. doi:10.1194/jlr.M500503-JLR200

38. Li J, Kanekiyo T, Shinohara M, *et al.* Differential regulation of amyloid- β endocytic trafficking and lysosomal degradation by apolipoprotein E isoforms. *J. Biol. Chem.* 2012;287:44593–44601. doi:10.1074/jbc.M112.420224
39. Kameyama S, Horie M, Kikuchi T, *et al.* Acid wash in determining cellular uptake of Fab/cell-permeating peptide conjugates. *Biopolymers* 2007;88:98–107. doi:10.1002/bip.20689
40. Shi ST, Lee K-J, Aizaki H, *et al.* Hepatitis C Virus RNA Replication Occurs on a Detergent-Resistant Membrane That Cofractionates with Caveolin-2. *J. Virol.* 2003;77:4160–4168. doi:10.1128/JVI.77.7.4160-4168.2003
41. Sagan SM, Rouleau Y, Leggiadro C, *et al.* The influence of cholesterol and lipid metabolism on host cell structure and hepatitis C virus replication. *Biochem. Cell Biol.* 2006;84:67–79. doi:10.1139/o05-149
42. Fitzgerald ML, Mujawar Z, Tamehiro N. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. *Atherosclerosis.* 2010;211:361–370. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.011
43. Ali K, Lund-Katz S, Lawson J, *et al.* Structure-function properties of the apoE-dependent COX-2 pathway in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2008;196:201–209. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.03.038
44. Lin C-Y, Duan H, Mazzone T. Apolipoprotein E-dependent cholesterol efflux from macrophages: kinetic study and divergent mechanisms for endogenous versus exogenous apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* 1999;40:1618–1626.
45. Langer C, Huang Y, Cullen P, *et al.* Endogenous apolipoprotein E modulates cholesterol efflux and cholesteryl ester hydrolysis mediated by high-density lipoprotein-3 and lipid-free apolipoproteins in mouse peritoneal macrophages. *J. Mol. Med.* 2000;78:217–227.
46. Yancey PG, Yu H, Linton MF, *et al.* A Pathway-Dependent on ApoE, ApoAI, and ABCA1 Determines Formation of Buoyant High-Density Lipoprotein by Macrophage Foam Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1123–1131. doi:10.1161/ATVBAHA.107.139592
47. Chen J, Zhang X, Kusumo H, *et al.* Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: Implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2013;1831:263–275. doi:10.1016/j.bbalip.2012.09.007
48. Hafiane A, Bielicki JK, Johansson JO, *et al.* Novel Apo E-Derived ABCA1 Agonist Peptide (CS-6253) Promotes Reverse Cholesterol Transport and Induces Formation of pre β -1 HDL In Vitro. *PLoS ONE* 2015;10:e0131997. doi:10.1371/journal.pone.0131997
49. **Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, *et al.*** ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 2005;1:121–131. doi:10.1016/j.cmet.2005.01.002

50. **Kiss RS, McManus DC**, Franklin V, *et al.* The Lipidation by Hepatocytes of Human Apolipoprotein A-I Occurs by Both ABCA1-dependent and -independent Pathways. *J. Biol. Chem.* 2003;278:10119–10127. doi:10.1074/jbc.M300137200
51. Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, *et al.* LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1310–6. doi:10.1161/01.ATV.0000218998.75963.02
52. Gaudreault N, Kumar N, Posada JM, *et al.* ApoE Suppresses Atherosclerosis by Reducing Lipid Accumulation in Circulating Monocytes and the Expression of Inflammatory Molecules on Monocytes and Vascular Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:264–272. doi:10.1161/ATVBAHA.111.238964
53. Zhang WY, Gaynor PM, Kruth HS. Apolipoprotein E produced by human monocyte-derived macrophages mediates cholesterol efflux that occurs in the absence of added cholesterol acceptors. *J. Biol. Chem.* 1996;271:28641–28646.

Author names in bold designate shared co-first authorship

SUPPLEMENTARY DATA

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and antibodies. Human recombinant apoE3, apoE2, apoE4, chlorpromazin (CPZ), filipin (FPN), Heparinase III and the liver X receptor (LXR) agonist T0901317 were obtained from Sigma-Aldrich[®]. Human purified VLDL and IDL/LDL were purchased from BioVision. Mouse monoclonal anti-apoE (ab1906), mouse monoclonal anti- β -actin (ab8226), rabbit monoclonal anti-LDLR (ab52818), rabbit monoclonal anti-LRP1 (ab92544), and rabbit monoclonal anti-SR-B1 (ab52629), antibodies were obtained from Abcam. The mouse monoclonal anti-core (MA1-080) antibody was obtained from ThermoFisher Scientific. Mouse monoclonal anti-ABCA1 (sc-58919) and rabbit polyclonal anti-apoA1 (sc-30089) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Rabbit polyclonal anti-ABCG1 (13578-1-AP) was obtained from Proteintech[™]. The sheep polyclonal anti-NS5A antibody was kindly provided by Pr Mark Harris (University of Leeds, UK).

RNA interference assays. Specific pools of siRNAs targeting LDLR (L-011073-00), LRP1 (L-004721-00), SR-B1 (L-010592-00), ABCA1 (L-004128-00) and non-targeting control siRNA (D-001810-10-05) were purchased from Dharmacon Inc. Specific siRNA

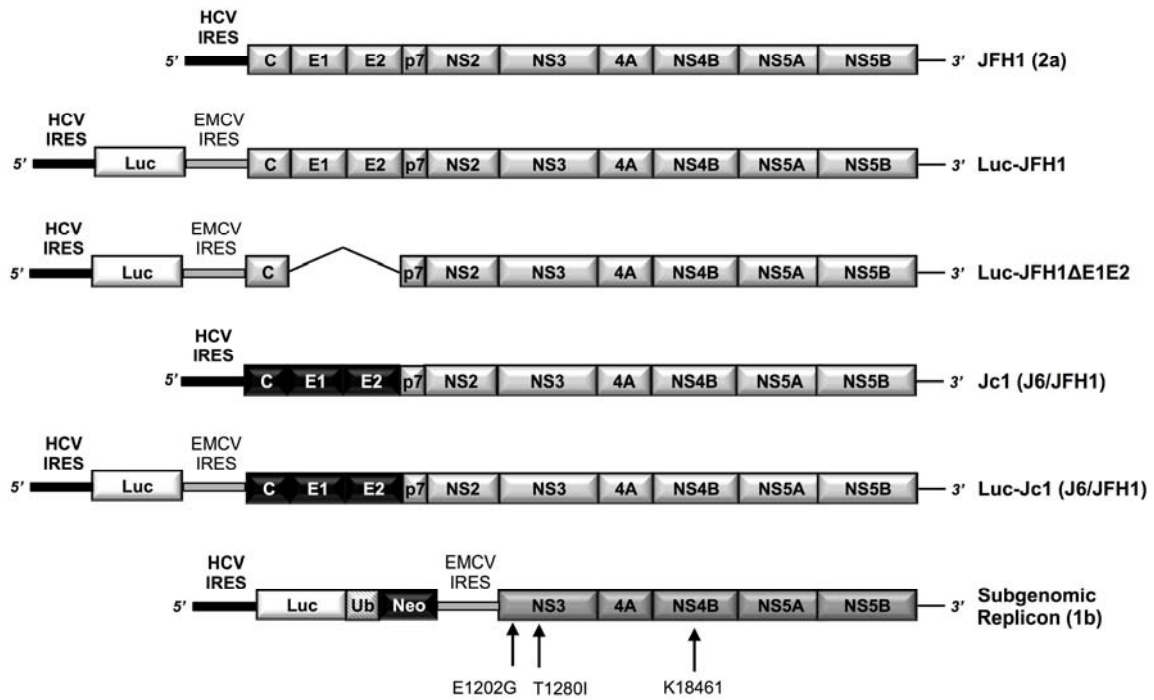
targeting ABCG1 (s18482) was purchased from Ambion, Life Technologies™. SiRNAs were reverse-transfected using Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies™). Three days post-transfection, target gene expression was assessed by Western blot analysis.

Cell proliferation assay. HCV replicating cells were treated with increasing amount of LF-apoE3 (2 to 10 µg/mL) for 24h or 48h, as described above. In parallel, a positive control was performed using DMSO (2 to 10%) to slow down cell proliferation. Cell proliferation was assessed by analyzing the ability to metabolize 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich®), as described (1).

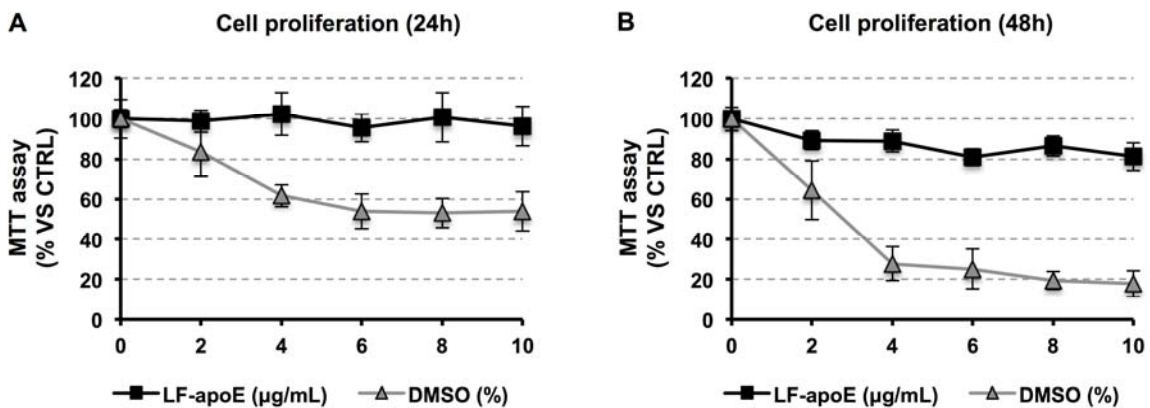
Iodixanol density gradient ultracentrifugation. HCV replicating cells (grown in 10% FBS medium or grown in serum-free medium) or PHH (grown in serum-free medium) were treated with LF-apoE3 at 6 µg/mL or PBS (CTRL). Culture media were collected 48h post-treatment. Lipoprotein separation was performed using a flotation iodixanol gradient protocol adapted from Yee *et al.* (30). A 20% iodixanol/sample solution was prepared by diluting 2.25 ml Optiprep™ (Sigma-Aldrich®) with 4.5 ml of cell supernatant. Iodixanol solutions 9% and 12% were prepared by diluting 9 ml of 60% iodixanol (Optiprep™) with 51 ml of 0.1 M HEPES-buffered saline (0.85 g NaCl in 90 ml distilled water, with 10 ml of 1 M HEPES added, adjusted to pH 7.4) and 12 ml Optiprep™ with 48 ml HEPES-buffered saline, respectively. The gradient was prepared by placing 3 mL of the 9% solution in a polycarbonate centrifugation tube (number 355603, 10.4 ml). This was under-layered with 3 ml of the 12% solution and with 3 ml of the 20% iodixanol/sample solution. The tube was then carefully filled to the top with HEPES-buffered saline and capped. The tubes were centrifuged using Ti-70.1 rotor at 65,000 rpm (388,000 g) at 4°C for 6 h in an Beckman Optima™ LE-80k ultracentrifuge (Beckman Coulter) (slow acceleration and deceleration). Fractions were collected using the Biologic LP™ system (Biorad) that pumped 0.5 mL per fraction *via* a syringe river set at 60 mL/h. ApoAI and apoE were detected in the 21 fractions harvested by WB analysis.

REFERENCE

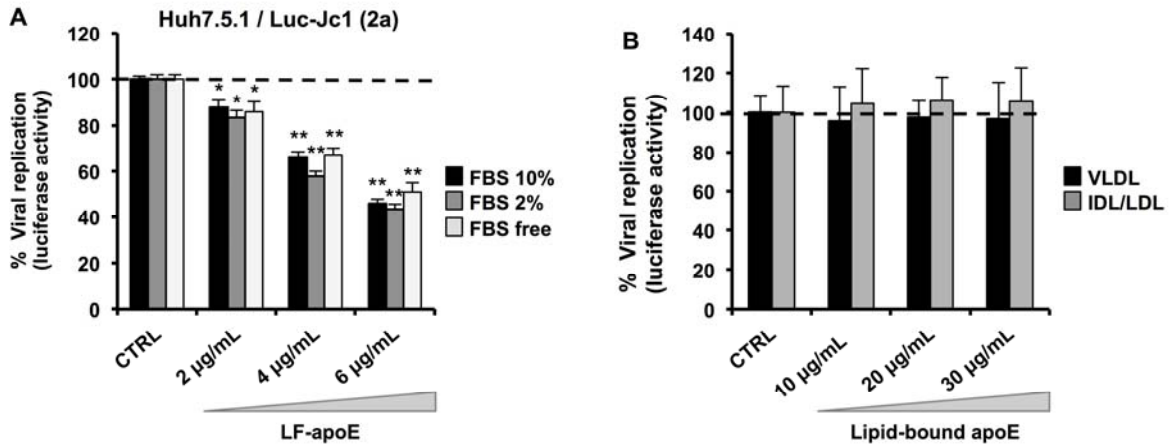
1. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983 ; 65 :55-63.



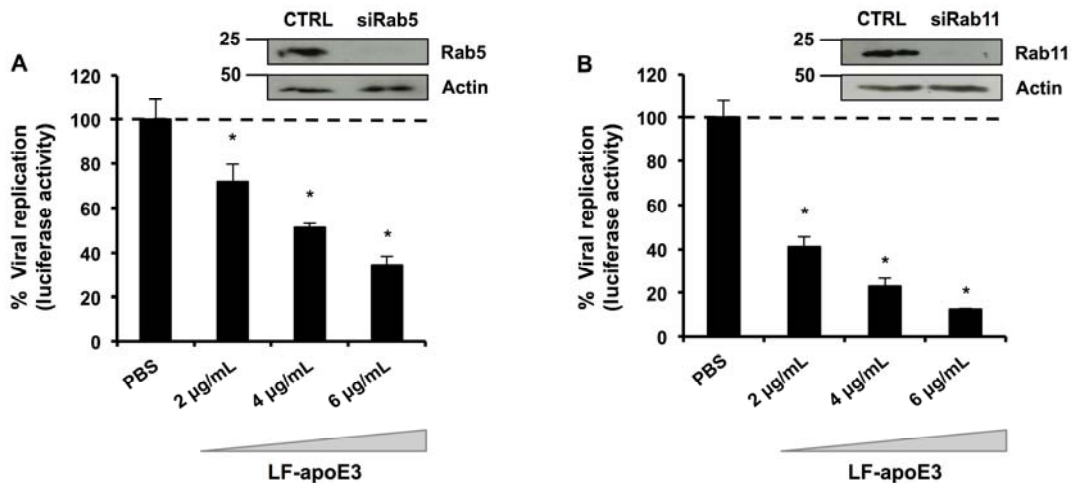
Supplementary figure S1. Schematic representation of viral genomes used in this study JFH1 corresponds to the full-length HCV Japanese fulminant hepatitis 1 genome (genotype 2a). Luc-JFH1 is the corresponding virus carrying the firefly luciferase reporter gene under the control of HCV IRES and JFH1 structural and non-structural proteins genes under the control of the IRES of encephalomyocarditis virus (EMCV IRES). Luc-JFH1ΔE1E2 is a Luc-JFH1-derived virus lacking the coding region for envelope glycoproteins E1 and E2. Jc1 is a chimeric HCV genome, which consists of J6CF structural protein and JFH1 non-structural protein segments. Luc-Jc1 represents the correspondent virus carrying the firefly luciferase reporter gene. The bicistronic, subgenomic replicon genotype 1b is composed of the HCV 5' non-translated region (NTR) plus nt 342–377 of the core-encoding region, the firefly luciferase gene sequence (Luc), the ubiquitin-encoding sequence (Ubi), the *neo* gene (neomycin resistance), the EMCV IRES, the coding region of the HCV non-structural proteins NS3–NS5B containing cell culture-adaptive mutations (black arrow) and the HCV 3' NTR.



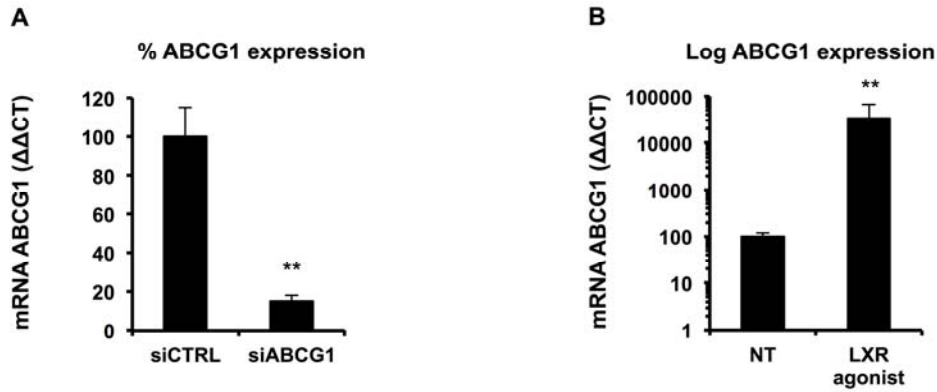
Supplementary figure S2. LF-apoE3 treatment does not affect Huh7.5.1 cell proliferation. HCV replicating cells were treated with LF-apoE3 (2 to 10 μg/mL) or DMSO (2 to 10%) as a control for cell proliferation inhibition, for 24h or 48h. Cell proliferation was assessed by MTT assay. Means ± SD from three independent experiments performed in triplicate are shown.



Supplementary figure S3. LF-apoE3 impairs HCV replication independently of serum components. (A) FBS does not interfere with LF-apoE3 effect on HCV replication. LF-apoE3 was diluted in DMEM medium containing 10, 2 or 0% of FBS and added to HCV replicating cells for 24h. Viral replication was determined by measuring luciferase activity (B) Lipoprotein-bound apoE has no effect on HCV replication. HCV replicating cells were treated with VLDL or IDL/LDL for 48h. Viral replication was assessed by measuring luciferase activity. Results are presented as % luciferase activity relative to CTRL non-treated HCV replicating cells (100%). Means \pm SD from five (A) or three (B) independent experiments performed in triplicate are shown. . *p < 0.01; ** p < 0.001



Supplementary figure S4. Blocking apoE recycling does not impact LF-apoE3's effects on HCV replication. Knockdown of the GTPases Rab5 and Rab11 does not alter the inhibitory effect of LF-apoE3 on HCV replication. (A-B) HCV replicating cells were reverse-transfected with siRNA targeting Rab5 (A) and Rab11 (B) respectively. After 48h, cells were treated with LF-apoE3. Viral replication (luciferase activity) was quantified 48h post-treatment. (A, B) Silencing efficacy was assessed by WB. Results are expressed as % luciferase activity relative to cells Rab5- or Rab11-silenced HCV replicating cells treated with PBS (PBS, set at 100%). Means \pm SD from two independent experiments done in triplicate are shown. . *p < 0.01; ** p < 0.001



Supplementary figure S5. Analysis of ABCG1 expression by RT-qPCR 72h after RNA silencing (A), or 8h after T0901317 treatment (B). Means \pm SD from five (A) and two (B) independent experiments done in triplicate are shown. . ** p < 0.001

III. Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous avons démontré pour la première fois qu'apoE extracellulaire sous sa forme libre inhibe la réplication du HCV grâce à sa fonction régulatrice du métabolisme lipidique. En effet, des quantités croissantes d'apoE ajoutées dans le milieu de culture des cellules répliquant le virus, induisent un efflux de cholestérol ABCG1-dépendant afin de promouvoir la synthèse d'HDL. Ainsi, apoE libre diminue la quantité de cholestérol intracellulaire disponible pour la réplication du virus. Cet effet est dose-dépendant, spécifique et durable dans le temps, pouvant mener à une diminution de la réplication virale jusqu'à 2 logs en 10 jours. Cet effet, a été observé sur la réplication des génotypes viraux 2a et 1b, suggérant qu'apoE libre pourrait avoir une activité pangénotypique intéressante pour le développement éventuel d'une stratégie thérapeutique.

ApoE endogène VS apoE exogène

Au vu du rôle d'apoE dans le cycle viral du HCV, les résultats obtenus dans cette étude peuvent paraître surprenants mais s'expliquent par le fait que nous étudions un aspect très différent de la protéine. Alors que la plupart des études s'intéressent à l'apoE endogène liée au virus, nous étudions la protéine exogène non liée aux lipoprotéines. Des expériences réalisées précédemment dans notre laboratoire ont d'ailleurs illustré cette différence. Nous avons montré que le *silencing* d'apoE intracellulaire (endogène) dans des cellules infectées par HCV, ou au contraire la surexpression d'apoE intracellulaire grâce à un vecteur adénoviral, impactaient fortement la production de particules infectieuses mais

pas la réplication virale (Lefèvre *et al.*, 2014). Au cours de ces expériences, seule l'expression de l'apoE endogène est modulée. L'effet potentiel de l'apoE exogène qui serait produite par les cellules n'est pas pris en compte. A l'opposé dans notre étude, nous ajoutons l'apoE libre exogène à dans le milieu de culture des cellules répliquant HCV. Nous avons observé que l'apoE libre doit être captée par les cellules pour avoir un effet sur la réplication virale. En effet, bloquer les interactions entre l'apoE libre et la cellule en utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre apoE ou bloquer son entrée en utilisant la filipine, inhibe les effets de l'apoE libre sur la réplication virale. Ces observations suggèrent que l'apoE libre exogène doit interagir avec la cellule pour déclencher une réponse cellulaire, aboutissant à un efflux de cholestérol et une diminution de la réplication virale. Cette réponse cellulaire n'est pas reproduite par la surexpression de l'apoE endogène, renforçant l'idée de la nécessité de l'interaction entre la cellule et l'apoE exogène. En accord avec nos observations, deux études ont montré qu'en réalisant des expériences avec des macrophages, l'apoE libre exogène est capable d'activer plusieurs voies de signalisation cellulaire dont la voie PI3K-PKC-Sp1 qui régule le métabolisme lipidique, ceci en interagissant avec un récepteur cellulaire encore inconnu (Zhao *et al.*, 2011 ; Okoro *et al.*, 2012).

Un récepteur inconnu

Au vu de ces résultats, nous avons voulu identifier le récepteur cellulaire impliqué dans l'effet inhibiteur d'apoE libre. Nous avons observé que les récepteurs hépatiques classiques connus pour lier apoE n'étaient pas impliqués dans l'inhibition du virus, à savoir les HSPG, le LDLR, le LRP1 et le SR-BI. A l'heure actuelle, nous n'avons pas identifié ce récepteur. En 2012, une équipe a démontré qu'apoE libre pouvait induire l'activation d'une voie de signalisation cellulaire dans les macrophages *via* le VLDLR (Chen *et al.*, 2012). Cependant, ce récepteur n'est que peu exprimé à la surface des hépatocytes et son expression ne semble induite qu'en conditions de stress et d'hypoxie, faisant du VLDLR un candidat peu probable dans notre étude (Nimpf et Schneider, 2000 ; Ujino *et al.*, 2015). D'autres récepteurs hépatiques pourraient constituer des récepteurs atypiques d'apoE et être impliqués dans l'inhibition de la réplication du HCV. Le CD36 et le P2Y13R pourraient être de bons candidats. En effet, ces 2 récepteurs régulent le métabolisme des HDL et peuvent se lier aux lipoprotéines (Fabre *et al.*, 2010 ; Brundert *et al.*, 2011 ; Röhrli et Stangl, 2013 ; Goffinet *et al.*, 2014). Le rôle potentiel de ces deux récepteurs dans l'inhibition apoE-dépendante du HCV pourrait être étudié dans la suite de

ce travail. L'existence d'un récepteur non canonique d'apoE a déjà été suggérée (Ali *et al.*, 2008). En plus de son rôle de régulateur du métabolisme lipidique, apoE module d'autres processus physiologiques comme l'inflammation et l'immunité, le stress oxydatif et la prolifération des cellules musculaires lisses endothéliales. En effet, une étude publiée en 2008 a décrit un mécanisme par lequel l'apoE libre humaine régule la prolifération des cellules musculaires *via* un récepteur distinct du LDLR, du LRP1 et des HSPG. De manière intéressante, l'apoE liée aux lipides ne peut pas réguler ce processus, indiquant que les formes libres et liées de la protéine ne possèdent pas les mêmes propriétés (Ali *et al.*, 2008). Ces observations corroborent les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse.

ApoE libre VS apoE lipidée

Au cours de notre étude, nous avons également déterminé que contrairement à l'apoE libre, l'apoE liée aux lipoprotéines comme les VLDL, ajoutée dans le milieu de culture de cellules répliquant le virus, n'avait pas d'effet inhibiteur sur la réplication virale. Cette différence s'explique probablement par le fait que la conformation des formes libres et liées de la protéine est très différente, comme illustré sur la **figure 35**. En effet, en présence de phospholipides, comme à la surface d'une lipoprotéine, apoE adopte une structure discoïde, en forme de ceinture (« *belt-like* »), pour entourer la surface phospholipidique (Lu *et al.*, 2000 ; Saito *et al.*, 2001, Hatters *et al.*, 2005).

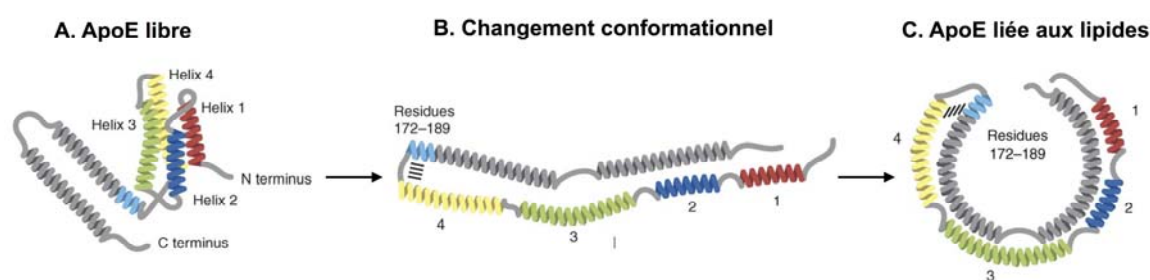


Figure 35. Différence conformationnelle entre les deux formes libre et liée d'apoE. (A) Conformation de l'apoE libre. Comme décrit précédemment, l'apoE libre possède 2 domaines distincts séparés par une région charnière: un domaine de liaison au récepteur en Nter (4 hélices représentées en jaune, vert, rouge et bleu) et un domaine de liaison aux lipides en Cter (représenté en gris). Le domaine de liaison au LDLR se trouve dans l'hélice 4 (jaune) (B) En présence de phospholipides, le domaine Nter adopte une conformation ouverte pour exposer leurs parties hydrophobes vers la surface lipidique. (C) ApoE liée aux lipides adopte une forme discoïde entourant la surface lipidique comme une ceinture. Figure adaptée de Hatters *et al.*, 2006.

La conformation de l'apoE liée aux lipoprotéines lui permet de se lier avec une forte affinité au LDLR, contrairement à la forme libre d'apoE. Il s'agit d'une « sécurité » pour les cellules productrices d'apoE, afin d'éviter une liaison précoce de l'apoE libre au LDLR en cours de synthèse dans la cellule (Hatters *et al.*, 2006). Si comme notre hypothèse le suggère, apoE libre se lie à un récepteur cellulaire non canonique, les différences conformationnelles observées pour les deux formes d'apoE expliqueraient que l'apoE liée aux VLDL ne puisse pas se lier à un tel récepteur. Cette observation explique le fait qu'apoE libre inhibe également la réplication virale en absence de sérum dans le milieu de culture cellulaire.

L'inhibition de la réplication du HCV par apoE est induite par la forme sauvage apoE3

A cours de nos travaux, nous avons également démontré que les isoformes mutantes apoE2 et apoE4 n'avaient pas d'effet inhibiteur sur la réplication du HCV. Ces observations démontrent d'une part que les effets sur la réplication virale sont spécifiques de la forme sauvage apoE3, et d'autre part que la conformation de l'apoE libre semble primordiale. Les isoformes d'apoE ne diffèrent que par seul un acide aminé, qui change néanmoins la structure et la fonction de la protéine (**Figure 36**). ApoE2 possède une substitution du résidu Arg158 par une cystéine qui perturbe la structure du domaine de liaison au récepteur (Hatters *et al.*, 2006). Une telle mutation pourrait expliquer qu'apoE2 ne puisse pas interagir avec le récepteur cellulaire impliqué dans le phénomène observé. ApoE4 quant-à-elle possède une substitution du résidu Cys112 par une arginine, qui déstabilise la structure et entraîne la formation d'un domaine d'interaction supplémentaire au sein de la protéine. Ce domaine d'interaction est responsable d'une liaison préférentielle d'apoE4 sur les VLDL mais aussi d'un recyclage différent de la protéine par les hépatocytes (Hatters *et al.*, 2006 ; Heeren *et al.*, 2007). Plusieurs études ont démontré qu'apoE4 ne semble pas interagir avec les mêmes composants cellulaires qu'apoE3. Par exemple dans le cerveau, l'apoE4 libre est impliquée dans le développement de la maladie d'Alzheimer car elle possède un défaut de liaison au peptide A β et ne peut donc pas assurer son élimination par les neurones (Mahley, 2016). Dans les macrophages, apoE4 libre n'induit que faiblement la voie de signalisation PI3K-PKC-Sp1 causant ainsi une dérégulation du métabolisme lipidique de la cellule (Zhao *et al.*, 2011 ; Okoro *et al.*, 2012). Enfin, dans les hépatocytes et les macrophages apoE4 est associée à une accumulation de lipides car elle n'active que faiblement les mécanismes d'efflux de cholestérol (Heeren *et*

al., 2007). Dans notre étude, il est donc possible qu'apoE4 ne puisse pas interagir avec les éléments induisant la réponse cellulaire responsable de l'efflux de cholestérol et conduisant à l'inhibition de la réplication du HCV.

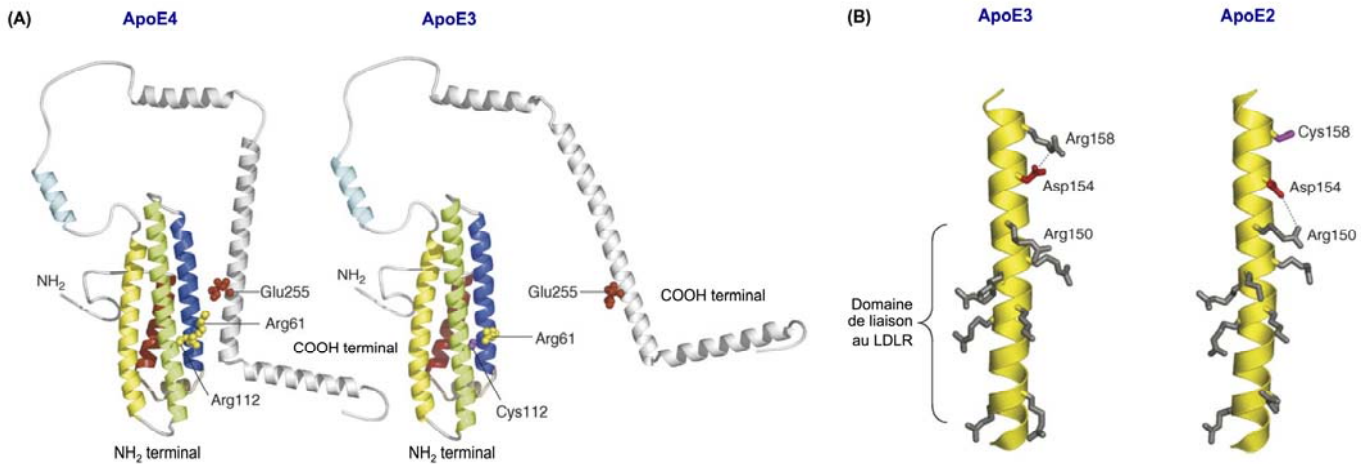


Figure 36. Différences structurales entre les 3 principales isoformes d'apoE. (A) Dans la forme apoE4, le résidu Cys112 est substitué par une arginine, avec pour conséquence la formation un domaine d'interaction entre Arg61 et Glu255. La forme apoE4 a une conformation différente de l'apoE3, beaucoup plus instable. (B) Dans la forme sauvage apoE3, le résidu Arg158 interagit avec l'Arg150. La présence d'une cystéine dans la forme apoE2 affecte cette interaction clé en interagissant préférentiellement avec l'Arg150, changeant ainsi sa conformation et ses propriétés de liaison aux récepteurs. (Adapté de Hatters *et al.*, 2006).

L'importance d'ABCG1 dans l'inhibition de la réplication virale.

Les hépatocytes expriment deux transporteurs majeurs du cholestérol, qui sont ABCA1 et ABCG1. Ils agissent très souvent de concert pour induire un efflux de cholestérol vers un accepteur extracellulaire permettant la formation d'HDL, mais également pour prévenir une accumulation de cholestérol hépatotoxique. ABCA1 induit un efflux de cholestérol sur l'apoAI libre pour former des HDL naissantes discoïdes. Ces HDL sont ensuite enrichies en cholestérol par ABCG1 pour former des particules matures. Contrairement à ABCA1, ABCG1 ne peut pas induire d'efflux de cholestérol vers apoAI, mais uniquement vers des HDL naissantes ou matures (Fitzgerald *et al.*, 2010 ; Ailing *et al.*, 2012).

Au cours de nos travaux, nous avons démontré qu'apoE libre inhibait la réplication virale en induisant un efflux de cholestérol ABCG1-dépendant. ApoE ne pouvant pas interagir directement avec ABCG1, ces résultats suggéraient qu'apoE agissait sur la synthèse des HDL. Cette hypothèse a été vérifiée au cours de nos travaux. En effet nous avons observé qu'apoE libre augmentait à la fois l'expression d'apoAI et la production d'HDL. Cette observation corrèle avec une étude démontrant qu'apoE prévient le développement de l'athérosclérose chez la souris en augmentant la production d'apoAI-

HDL circulantes (Gaudreault *et al.*, 2012). Cependant, nous n'avons pas observé de rôle majeur d'ABCA1 dans l'inhibition de la réplication du HCV. Plusieurs études ont montré qu'apoAI pouvait être lipidée par les hépatocytes par deux mécanismes : un mécanisme ABCA1-dépendant qui a lieu à la surface de la cellule après sécrétion d'apoAI, et un mécanisme ABCA1-indépendant où apoAI interagit avec du cholestérol néosynthétisé directement dans la cellule au niveau du RE (Kiss *et al.*, 2003 ; Maric *et al.*, 2005 ; Zheng *et al.*, 2005). Dans notre modèle, nous privilégions l'hypothèse d'une lipidation d'apoAI directement dans la cellule pour former des HDL naissantes, qui une fois sécrétées peuvent interagir avec ABCG1. Un rôle d'ABCA1 ne peut pas être totalement exclu dans notre étude. Toutefois, l'inhibition de l'expression d'ABCA1 par ARN interférence ne suffit pas à restaurer la réplication virale en présence d'apoE, indiquant que ce mécanisme n'est pas majoritaire. En d'autres termes, un potentiel efflux de cholestérol ABCA1-dépendant n'est pas suffisant pour induire une inhibition de la réplication virale. En accord avec notre hypothèse, une étude a démontré que la surexpression d'ABCA1 dans des cellules infectées par HCV n'a pas d'effet sur la réplication virale (Bocchetta *et al.*, 2014). L'effet sur la réplication virale ne serait donc bien dû qu'à l'efflux de cholestérol ABCG1-dépendant. En 2006, Wang et ses collaborateurs ont montré qu'ABCG1 pouvait mobiliser le cholestérol du RE vers la membrane plasmique, pour induire un efflux de cholestérol vers les HDL (Wang *et al.*, 2006). La réplication virale ayant lieu au niveau de membranes dérivées du RE, plus précisément au niveau de microdomaines membranaires riches en cholestérol, nous pouvons penser qu'ABCG1 mobilise le cholestérol de ces domaines, inhibant ainsi la réplication du virus (Shi *et al.*, 2003, Ferraris *et al.*, 2010 ; Romero-Brey *et al.*, 2012).

Pour poursuivre ce travail, il serait intéressant de confirmer le rôle d'ABCA1 et d'ABCG1 dans le mécanisme étudié, en étudiant d'une part, l'impact du *silencing* d'ABCA1 dans la formation d'HDL apoE-dépendante et d'autre part en caractérisant le rôle d'ABCG1 dans l'inhibition de la réplication virale. En effet, nous envisageons de suivre l'impact d'un efflux de cholestérol ABCG1-dépendant sur la formation du complexe de réplication. Par microscopie confocale, nous pourrions également imaginer déterminer la localisation intracellulaire d'ABCG1 dans la cellule infectée par HCV et de suivre ses mouvements intracellulaires lors d'un traitement avec l'apoE libre. En 2011, une étude a montré qu'ABCG1 pouvait être localisé dans plusieurs compartiments cellulaires dont les endosomes tardifs (Tarling *et al.*, 2011). D'autres études, ont rapporté qu'après internalisation par la cellule, apoE pouvait mobiliser le pool de cholestérol intracellulaire

pour former des HDL (Heeren *et al.*, 2007). Une hypothèse intéressante serait qu'après son endocytose par un mécanisme *lipid-raft* dépendant, apoE libre induise une activation d'ABCG1 au niveau des endosomes, menant au transport du cholestérol vers la membrane plasmique. Cette hypothèse pourrait être rapidement confirmée ou infirmée par des expériences de colocalisation par microscopie confocale.

Un mécanisme physiologique impactant la réplication virale

De manière intéressante, nos travaux ont permis de mettre en évidence un nouveau rôle d'apoE dans la régulation du métabolisme lipidique hépatique. En effet, nous avons observé qu'apoE libre extracellulaire induisait un efflux de cholestérol ABCG1-dépendant aussi bien en présence du HCV qu'en contexte non viral. Physiologiquement, nous pouvons penser qu'apoE libre est fortement sécrétée par les hépatocytes en réponse à une accumulation de lipides dans la cellule. Par exemple, après une prise alimentaire riche en lipides, la formation de CM, de VLDL et de leur *remnants* peut induire une accumulation de lipides à la fois dans les cellules périphériques et dans les hépatocytes. ApoE libre sécrétée par les hépatocytes pourrait donc induire la formation d'HDL pour éliminer l'excès de cholestérol de ces cellules.

En cas d'infection virale, le virus induit une accumulation de lipides intracellulaires. Ce phénomène pourrait augmenter la production d'apoE par les hépatocytes ainsi que sa sécrétion sous forme libre. Nous pouvons alors imaginer 2 *scenarii*. Soit le virus détourne l'apoE néosynthétisée à son profit pour produire des particules virales infectieuses, soit l'apoE est fortement sécrétée sous forme libre et induit un efflux de cholestérol qui baisserait le taux de réplication virale. Ce dernier mécanisme participerait au contrôle de la réplication virale et à l'établissement de la chronicité de l'infection. Ainsi, HCV détournerait ce processus physiologique pour réguler sa propre réplication. Utiliser apoE libre pour réguler la réplication virale représente une réelle opportunité pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'administration d'apoE libre à des souris xénotreffées par des PHH et infectées par HCV pourrait constituer une première piste pour confirmer nos observations *in vivo*.

Pour aller plus loin : comprendre ou élucider la réponse cellulaire induite par apoE

Avant d'envisager le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique, nous devons aller plus loin dans la compréhension du mécanisme moléculaire impliqué dans la régulation de la réplication virale par apoE libre. Nous envisageons de caractériser la

réponse cellulaire induite dans les hépatocytes par apoE libre. Plusieurs évidences nous orientent vers l'*adenosine 5' monophosphate activated protein kinase* (AMPK). Il s'agit d'une kinase cellulaire contrôlant le statut énergétique de la cellule en régulant à la fois le métabolisme glucidique et lipidique de la cellule. Cette kinase est très exprimée dans le foie (Towler et Hardie, 2016). Plusieurs études ont montré que l'activation de l'AMPK inhibait la réplication du HCV. En effet, son activation induit une cascade de signalisation cellulaire inhibant à la fois la synthèse des lipides et stimulant l'efflux de cholestérol ABCG1-dépendant (Li *et al.*, 2010 ; Mankouri et Harris, 2011). De plus, il a été décrit qu'HCV induisait des dérégulations du métabolisme lipidique hépatique en inhibant cette protéine (Mankouri *et al.*, 2010 ; Nakashima *et al.*, 2011 ; Yu *et al.*, 2013). L'AMPK est donc une cible de choix pour inhiber la réplication du HCV. Nous avons donc réalisé des expériences préliminaires pour analyser l'effet de l'apoE libre sur l'AMPK. Nous avons pu observé que l'apoE libre activait l'AMPK en induisant une phosphorylation de sa sous-unité α .

De nombreux facteurs peuvent activer l'AMPK. De même, cette kinase module en aval l'expression de nombreux gènes du métabolisme lipidique (Mankouri et Harris, 2011 ; Towler et Hardie, 2016). **La figure 37** résume succinctement les pistes d'étude les plus intéressantes pour la suite de ce travail. L'étude de l'impact de l'apoE libre extracellulaire sur les voies de signalisation connues pour activer l'AMPK comme la voie PI3K/Akt et la voie des MAPK ou encore la voie LKB1 (*liver kinase B1*), dont le rôle dans le foie est peu documenté, nous permettra de mieux comprendre le mécanisme d'activation de l'AMPK par apoE libre. L'activation de l'AMPK dans les hépatocytes augmente le catabolisme des lipides à savoir la β oxydation. A l'opposé, l'AMPK réprime la synthèse des lipides en inhibant par exemple des enzymes-clés de la synthèse du cholestérol comme l'HMG-CoA réductase. L'AMPK peut aussi réprimer des facteurs de transcription importants de la famille des LXR (*liver X receptor*) et de SREBP, contrôlant l'expression des gènes de la voie de synthèse des lipides. Enfin, l'AMPK régule la capture et l'efflux des lipides en régulant l'expression des *ATP binding cassette*, du SR-BI, du CD36 ou encore du LDLR (Mankouri et Harris, 2011 ; Li *et al.*, 2011 ; Yap *et al.*, 2011 ; Towler et Hardie, 2016). Au vu de ces données, nous proposons d'étudier l'impact d'apoE libre sur l'expression de ces gènes clés du métabolisme lipidique régulés par l'AMPK et pouvant constituer des cibles potentielles de l'apoE libre

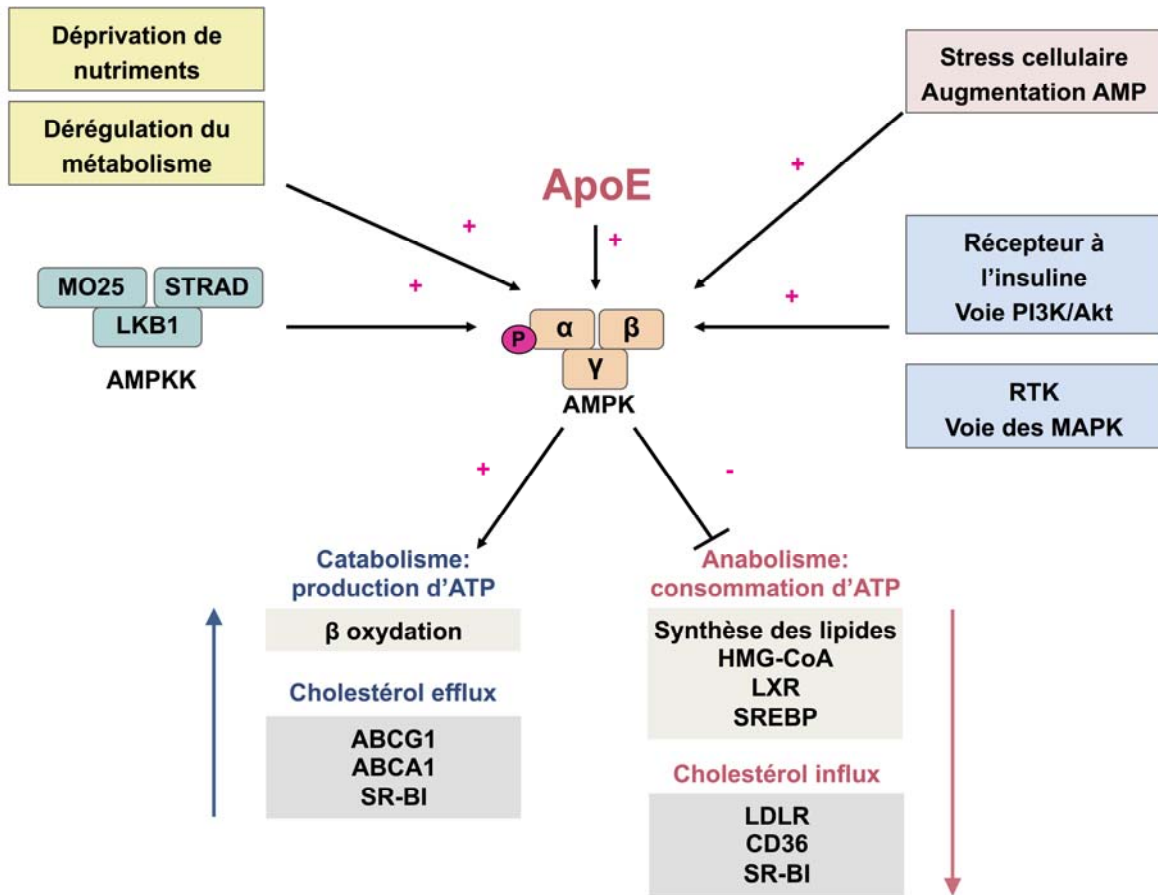


Figure 37. Les voies de signalisation de l'AMPK dans les hépatocytes. Dans les hépatocytes, l'AMPK peut être activée par plusieurs *stimuli*, pouvant correspondre à l'activation d'un récepteur cellulaire et/ou de voies de signalisation. L'AMPK est aussi un senseur de la quantité d'AMP dans la cellule pouvant varier lors d'une privation en nutriments ou un stress cellulaire. Nous avons également démontré que l'apoE libre pouvait activer l'AMPK par un mécanisme encore inconnu. L'activation de l'AMPK a pour conséquence une activation du catabolisme cellulaire et de l'efflux de lipides ainsi qu'une diminution de l'anabolisme cellulaire et de l'entrée de lipides, visant à réduire la quantité de lipides dans la cellule.

Pour aller plus loin : effet de l'apoE libre sur l'entrée virale

Nos travaux nous ont permis de comprendre les effets de l'apoE libre exogène sur la réplication virale. Par la suite, nous avons également voulu étudier les effets de l'apoE libre sur l'étape d'entrée virale en utilisant le modèle HCVpp. Nous avons réalisé une expérience préliminaire démontrant que le traitement de cellules Huh7.5.1 avec l'apoE libre inhibait l'entrée des HCVpp dans les cellules. L'entrée des HCVpp n'étant pas dépendante des composants de la LVP et du métabolisme des lipides, nous avons émis l'hypothèse qu'apoE libre pourrait modifier l'expression des facteurs d'entrée du virus. Nous avons donc évalué l'expression de plusieurs facteurs d'entrée par western blot. Les résultats obtenus nous ont montré qu'apoE libre diminuait de manière dose-dépendante la

quantité de CD81 et de LDLR dans les cellules Huh7.5.1. A l'opposé, apoE libre ne modifie pas l'expression du SR-BI ou de CLDN1. Ces expériences préliminaires doivent néanmoins être reproduites et confirmées.

L'expression du CD81 et du LDLR à la surface des hépatocytes peut être contrôlée par une protéine commune nommée PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin-kexin type 9*). En effet, PCSK9 peut se lier à ces deux récepteurs et induire leur endocytose et leur dégradation dans les lysosomes (Le *et al.*, 2015). Cette protéine possède un grand intérêt pour le développement d'une stratégie thérapeutique anti-HCV puisqu'il a été démontré que PCSK9 pouvait inhiber l'infection par HCV (Labonté *et al.*, 2009 ; Bridge *et al.*, 2015). Il serait donc intéressant d'étudier l'impact d'un traitement à l'apoE libre sur l'expression de PCSK9. De plus, l'expression de PCSK9 peut être elle-même contrôlée par l'AMPK, renforçant le fait qu'apoE libre peut modifier l'expression de PCSK9 par une voie AMPK dépendante (Yi *et al.*, 2011).

En conclusion, nous avons démontré un nouveau rôle d'apoE sous forme libre à la fois dans le métabolisme lipidique et dans le cycle viral du HCV. Ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives et pistes d'études qui seront exploitées dans notre laboratoire. Les effets de l'apoE libre seront par la suite analysés *in vivo* en utilisant un modèle murin. Nos travaux pourraient également à long terme, permettre l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

RESULTATS DEUXIEME PARTIE

Implication d'apoE dans le processus d'évasion aux anticorps neutralisants par le HCV.

I. Contexte de l'étude

Dans une seconde partie de mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle d'apoE associée à la LVP infectieuse, dans le cadre de la physiopathologie de l'infection par le HCV. A l'heure actuelle, l'élaboration d'un vaccin préventif contre HCV est entravée par la capacité du HCV à échapper au système immunitaire de l'hôte et notamment aux nAbs (Rehermann, 2009). Durant les premières phases de l'infection par HCV, les patients produisent des nAbs spécifiquement dirigés contre HCV, ces anticorps permettant d'inhiber l'entrée du virus dans les hépatocytes. Les cibles principales de ces nAbs sont les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, en particulier leurs régions hypervariables HVR (Fafi-Kremer *et al.*, 2012 ; Park et Rehermann, 2014). HCV a développé plusieurs mécanismes pour échapper aux nAbs. Tout d'abord, la grande variabilité des quasi-espèces, notamment dans les régions HVR, leur permet de ne plus être reconnues par les nAbs. Ensuite, les nombreuses glycosylations de E1 et E2 rendent difficile l'accès aux épitopes par les nAbs. Enfin, la transmission de cellule à cellule permet au virus d'être disséminé dans le foie sans entrer en contact avec les nAbs (Zeisel *et al.*, 2007 ; Fafi-Kremer *et al.*, 2012). L'association du HCV avec les lipoprotéines a également été proposé comme un mécanisme d'échappement aux nAbs, ceci en masquant les épitopes ciblés par ces derniers (Bartosch *et al.*, 2005 , Grove *et al.*, 2008 ; Fafi-Kremer *et al.*, 2012). Cependant, le rôle des composants des lipoprotéines, en particulier le rôle des apo, dans le processus d'échappement aux nAbs n'a jamais été décrit. ApoE étant un composant majeur de la LVP essentiel à l'infectiosité du virus, notre étude a consisté à déterminer le rôle d'apoE associée à la particule virale dans le mécanisme d'échappement viral aux nAbs.

Nous avons voulu élargir cette étude à plusieurs génotypes ou sous-types viraux différents, pour déterminer si apoE jouait un rôle dans l'échappement aux nAbs de manière pangénotypique. Nous avons pour cela utilisé des souches virales chimériques exprimant les protéines non structurales du JFH1 et les protéines structurales des génotypes 2a (Jc1),

1a (H77) et 1b (Con1). Nous avons également utilisé le variant VL (1b) dont les protéines structurales sont issues d'un variant sélectionné après TH chez un patient infecté. Le variant VL est caractérisé par une meilleure entrée dans les hépatocytes que les variants non sélectionnés après TH et une forte capacité d'échappement aux nAbs (Schvoerer *et al.*, 2007 ; Fafi-Kremer *et al.*, 2010).

Afin de déterminer si apoE est impliquée dans l'échappement du HCV aux nAbs, nous avons diminué l'expression d'apoE dans les cellules Huh7.5.1 répliquant les différentes souches virales par l'utilisation de siRNA spécifiques (siApoE), pour produire des particules virales déplétées d'apoE. En parallèle, nous avons produit des particules virales contrôles issues des cellules Huh7.5.1 non transfectées ou transfectées avec un siRNA contrôle. Nous avons ensuite testé l'infectiosité et la neutralisation par les nAbs des particules virales produites dans ces conditions.

Mon rôle dans cette étude a été de caractériser les particules virales Jc1 et VL produites dans des cellules Huh7.5.1 contrôles ou transfectées avec un siApoE. Pour cela, j'ai utilisé des virus Jc1 et VL exprimant une étiquette FLAG en fusion avec la glycoprotéine E2, cette étiquette me permettant d'immunoprécipiter les particules virales et de les purifier. J'ai ensuite analysé la présence des protéines E2 et apoE présentes à leur surface par western blot. En effet, nous devons nous assurer que les particules virales issues de cellules transfectées avec un siApoE possédaient moins d'apoE à leur surface que les particules contrôles, mais également que l'absence d'apoE n'affectait pas la quantité d'E2 présente à la surface du virus. Ces données s'avéraient cruciales pour comparer le profil de neutralisation par les nAbs des différentes particules virales. En utilisant la même technique, j'ai également purifié et caractérisé les particules virales de variants VL mutés pour un résidu spécifique de la glycoprotéine E2 impliqué dans la résistance du VL aux nAbs. Ces résultats sont présentés dans les figures 3 et 7 respectivement du manuscrit suivant.

II. Résultats

Les résultats concernant cette étude seront présentés sous forme d'un article scientifique publié dans le journal *Gastroenterology*.



Apolipoprotein E Mediates Evasion From Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies

Catherine Fauvelle,^{1,2,*} Daniel J. Felmlie,^{1,2,3,*} Emilie Crouchet,^{1,2} JiYoung Lee,⁴ Laura Heydmann,^{1,2} Mathieu Lefèvre,^{1,2} Andrea Magri,⁵ Marie-Sophie Hiet,⁴ Isabel Fofana,^{1,2} François Habersetzer,^{1,2,6} Steven K. H. Fong,⁷ Ross Milne,⁸ Arvind H. Patel,⁵ Koen Vercauteren,⁹ Philip Meuleman,⁹ Mirjam B. Zeisel,^{1,2} Ralf Bartenschlager,⁴ Catherine Schuster,^{1,2} and Thomas F. Baumert^{1,2,6}

¹Inserm, U1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, Strasbourg, France; ²Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ³University of Plymouth, Centre for Biomedical Research, Plymouth, UK; ⁴Department of Infectious Diseases, Molecular Virology, Heidelberg University, Heidelberg, Germany; ⁵MRC, University of Glasgow, Centre for Virus Research, Glasgow, UK; ⁶Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépatito-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁷Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California; ⁸Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Ottawa Heart Institute, Ottawa, Ontario, Canada; and ⁹Center for Vaccinology, Ghent University, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium

See Covering the Cover synopsis on page 2.

BACKGROUND & AIMS: Efforts to develop an effective vaccine against hepatitis C virus (HCV) have been hindered by the propensity of the virus to evade host immune responses. HCV particles in serum and in cell culture associate with lipoproteins, which contribute to viral entry. Lipoprotein association has also been proposed to mediate viral evasion of the humoral immune response, though the mechanisms are poorly defined. **METHODS:** We used small interfering RNAs to reduce levels of apolipoprotein E (apoE) in cell culture–derived HCV–producing Huh7.5–derived hepatoma cells and confirmed its depletion by immunoblot analyses of purified viral particles. Before infection of naive hepatoma cells, we exposed cell culture–derived HCV strains of different genotypes, subtypes, and variants to serum and polyclonal and monoclonal antibodies isolated from patients with chronic HCV infection. We analyzed the interaction of apoE with viral envelope glycoprotein E2 and HCV virions by immunoprecipitation. **RESULTS:** Through loss-of-function studies on patient-derived HCV variants of several genotypes and subtypes, we found that the HCV particle apoE allows the virus to avoid neutralization by patient-derived antibodies. Functional studies with human monoclonal antiviral antibodies showed that conformational epitopes of envelope glycoprotein E2 domains B and C were exposed after depletion of apoE. The level and conformation of virion-associated apoE affected the ability of the virus to escape neutralization by antibodies. **CONCLUSIONS:** In cell-infection studies, we found that HCV-associated apoE helps the virus avoid neutralization by antibodies against HCV isolated from chronically infected patients. This method of immune evasion poses a challenge for the development of HCV vaccines.

Keywords: Lipoviral Particle; Vaccination; Viral Escape; Lipid.

infection that can lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.¹ Direct-acting antivirals have markedly improved the treatment efficacy, but limitations due to access to screening and therapy persist, highlighting the need for an effective vaccine for global control and eradication of HCV infection. A consistent hallmark of vaccines against pathogens is their reliance on immunogens that elicit neutralizing antibodies (nAbs).² HCV vaccine development has been impeded by the viral adaptations to host immunity that enable chronic infection. Indeed, the host immune system lags behind the continuous evolution of HCV, allowing the virus to evade humoral immunity.^{3,4} However, the escape mechanisms from nAbs during chronic HCV infection are only partially understood. Clearly, the development of an effective vaccine requires a detailed understanding of viral evasion from host immune responses, including nAbs. Previous studies investigating the molecular mechanisms of HCV liver graft infection identified a viral variant termed VL^{5,6} with efficient escape from patient nAbs.^{5,6} Functional genetics had identified phenylalanine at HCV polyprotein residue 447 as being important for neutralization escape.⁶ This amino acid is widely conserved among HCV isolates, as shown by its prevalence of 98.4% in all genotypes (including Jc1, Japanese fulminant hepatitis virus [JFH1], and H77) and 96.2% in genotype 1b strains (including VL).⁶ In addition, previous studies had shown

*Authors share co-first authorship.

Abbreviations used in this paper: apo, apolipoprotein; E2, envelope glycoprotein E2; HCV, hepatitis C virus; HCVcc, cell culture–derived HCV; Jc1E2(FLAG), J6-JFH1 chimera with FLAG epitope in E2; JFH1, Japanese fulminant hepatitis virus; LDL, low-density lipoprotein; Luc-Jc1, J6-JFH1 chimera with luciferase reporter; mAb, monoclonal antibody; mRNA, messenger RNA; nAb, neutralizing antibody; PCR, polymerase chain reaction; siRNA, small interfering RNA; TRL, triglyceride-rich lipoprotein.

Most current article

© 2016 by the AGA Institute
0016-5085/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.014>

Hepatitis C virus (HCV) is a major health problem infecting approximately 130 million individuals worldwide. HCV infection typically results in a chronic

that replacement of phenylalanine by leucine (F447L) rendered HCV highly susceptible to neutralization.⁶

An interesting characteristic of HCV particles is their association with triglyceride-rich lipoproteins (TRL) and low-density lipoproteins (LDL) forming hybrid lipoviral particles, which results in a population of virions that are heterogenous in buoyant density.⁷⁻⁹ Apolipoprotein (apo) B, E, AI, and CI have been described as lipoviral particles components.¹⁰ ApoE is important for both HCV infection of hepatocytes and hepatic uptake of TRL remnants, while the role of apoB, the structural protein of TRL and LDL, in the HCV life cycle is less clear. ApoCI may be involved in viral fusion,¹¹ and apoAI can affect HCV replication and production. Although association with TRL and LDL has been hypothesized to contribute to viral evasion,^{7,12} the role of specific apolipoproteins in HCV persistence is unknown. Given that apoE is a host protein incorporated into the HCV

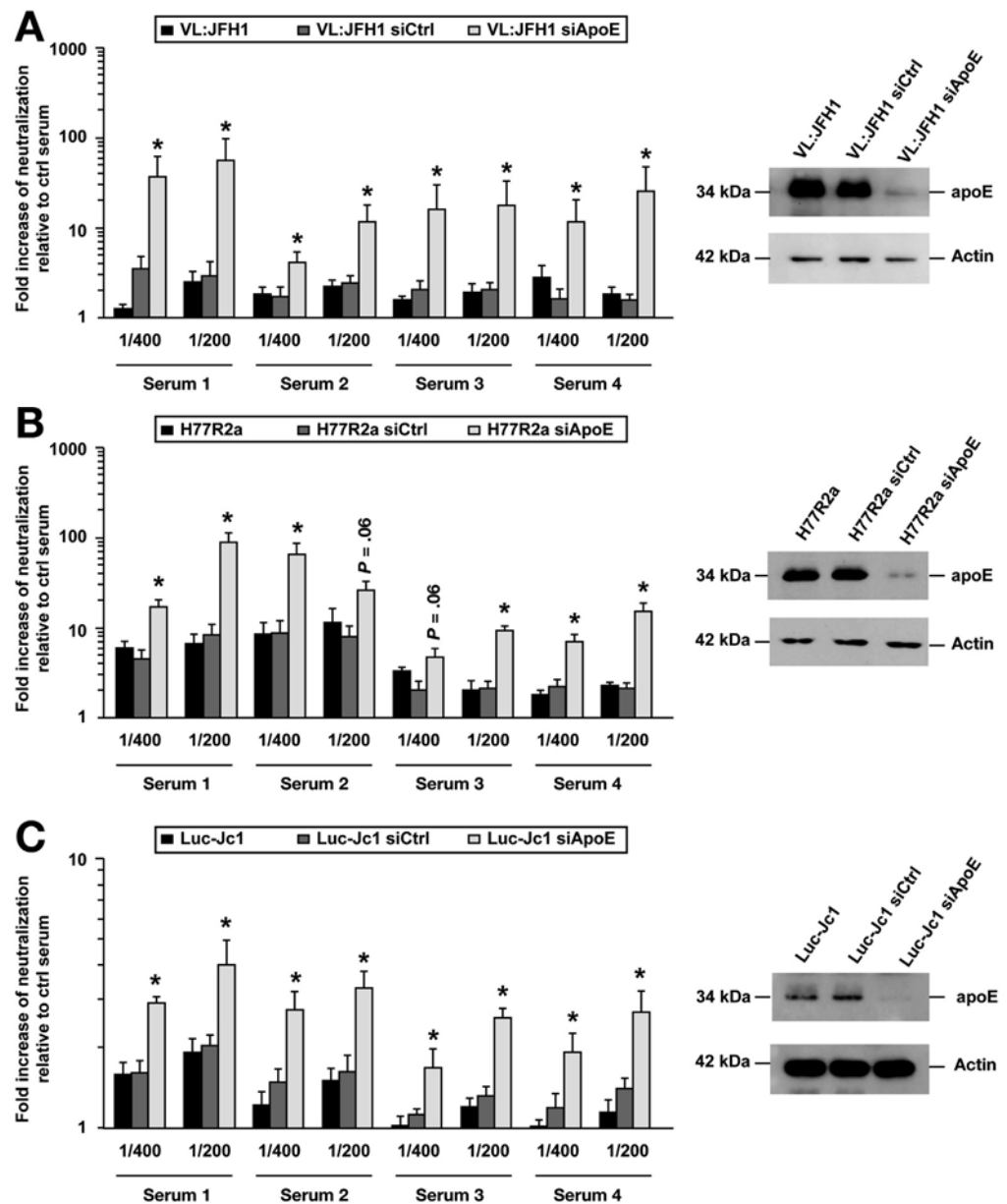
particle and is required for virion production, we sought to determine its functional role in viral evasion from host nAbs. Our findings reveal a previously undiscovered mechanism of viral escape specific to apoE, independent of TRL binding, and identify a residue in envelope glycoprotein E2 (E2) that contributes to this phenotype. These results define a novel challenge for the development of vaccines and immunopreventive approaches.

Materials and Methods

Patient Samples

Serum samples from patients with chronic HCV infection were obtained with informed consent and approval from the Strasbourg University Hospital's Institutional Review Board (CPP 10-17). Sera termed 1, 2, and 4 came from patients

Figure 1. Depletion of apoE in HCV producer cells efficiently sensitizes HCV virions to antibody-mediated neutralization. Huh7.5.1 cells were either electroperated with VL:JFH1 (A), H77R2a (B) or Luc-Jc1 RNA (C) alone, or co-electroporated with either scrambled siRNA (siCtrl) or siRNA targeting apoE mRNA (siApoE). Neutralization experiments using sera produced from these cells were performed using sera from 4 different HCV-infected patients (1, 2, 3, or 4) at the indicated dilutions. Infection was determined by end-point dilution assay (A) or luciferase activity (B, C). Mean \pm SEM from 7 experiments (A) or 3 experiments performed in duplicate (B, C) are shown. Results are expressed as fold increase of neutralization relative to control serum. ApoE depletion in producer cells was confirmed 72 hours post electroperation by immunoblotting of cell lysates; actin was detected as loading control. * $P < .05$.



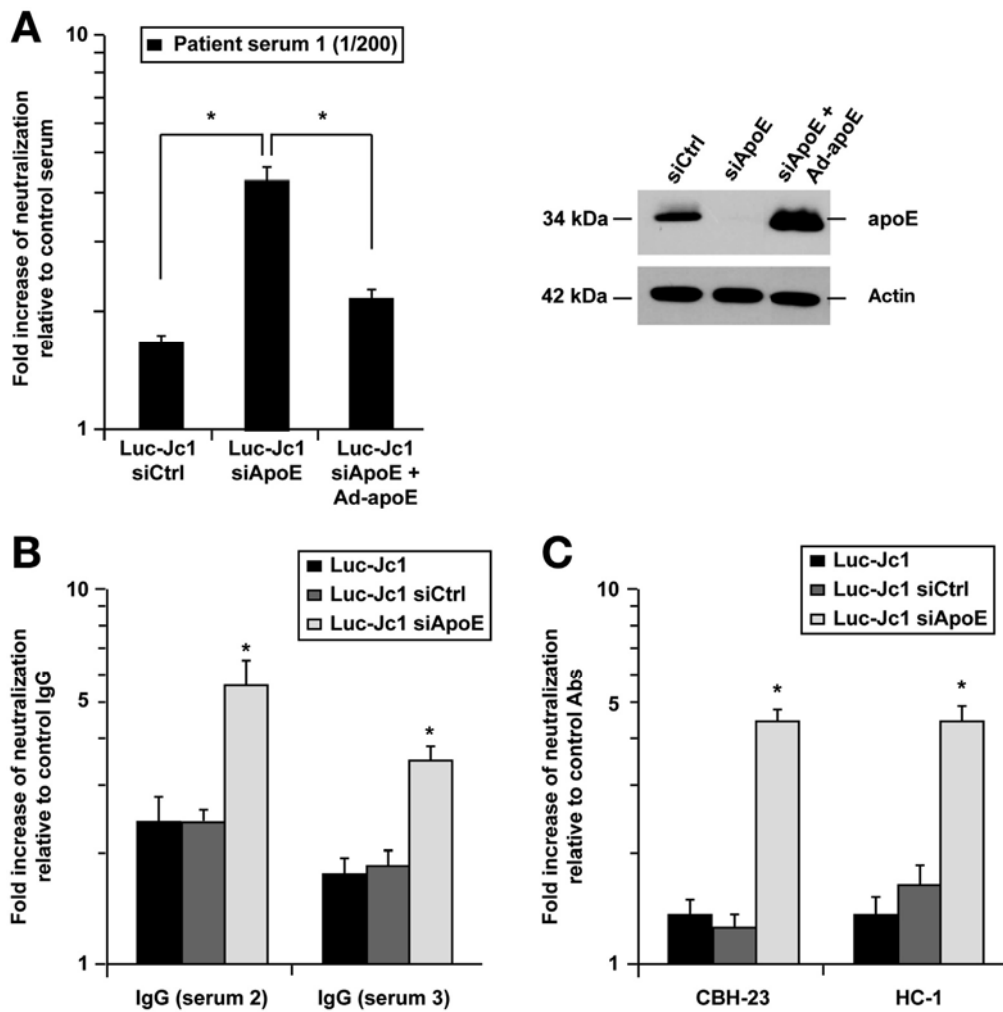


Figure 2. (A) Trans-complementation of apoE expression in producer cells restores viral evasion from nAbs. Huh7.5.1 cells were electroporated with Luc-Jc1 RNA alone, or co-electroporated with either scrambled siRNA (siCtrl) or siRNA targeting apoE mRNA (siApoE). ApoE expression was then rescued using adenoviral apoE expression vectors transducing apoE knockdown cells. Neutralization experiments of viruses were performed using HCV-infected patient serum 1 at dilution 1/200. Infection was determined by quantification of luciferase activity. Results are expressed as fold increase of neutralization relative to control serum. ApoE knockdown was confirmed 72 hours post electroporation by immunoblotting (*lower panel*); actin was detected as loading control. Means \pm SEM from 3 experiments are shown. * $P < .01$. (B, C) ApoE-depletion results in enhanced neutralization by purified IgG from patient sera and human monoclonal antibodies. Huh7.5.1 cells were electroporated with Luc-Jc1 RNA alone, or co-electroporated with either scrambled siRNA (siCtrl) or siRNA targeting apoE mRNA (siApoE). Viruses produced from these cells were incubated with (B) purified IgG (25 μ g/mL) from HCV-infected patient serum 2 and 3 or (C) human monoclonal anti-E2 antibodies CBH-23 and HC-1 (10 μ g/mL). Infection was determined as described in (A). Results are expressed as fold increase of neutralization relative to control IgG. Means \pm SEM from 3 experiments are shown. * $P < .01$.

infected by HCV genotype 1 and serum 3 from a genotype 2 patient.

Cells and Reagents

Huh7.5.1 and Huh7.5 green fluorescent protein cells were cultured as described previously.¹³ Small interfering RNAs (siRNAs) targeting apoE 3' untranslated region (siApoE) (5'CUGCAGCGGAGACCCUGU 3') or apoB and control siRNAs were from Dharmacon (Lafayette, CO). Mouse anti-apoE (ab8226) monoclonal antibody (mAb) and anti- β -actin (ab1906) for immunoblot were obtained from Abcam (Cambridge, MA). Mouse anti-apoE (1D7, 3H1, 6C5), rat anti-CD81 (QV-6A8-F2-C4), mouse anti-E2 (AP33),¹⁴⁻¹⁶ and human

anti-E2 (CBH-23 and HC-1)¹⁷ mAbs have been described. Sheep anti-NS5A serum was a kind gift from M. Harris.¹⁸ Human anti-E2 antibody AR3B was a kind gift from M. Law.¹⁹ Antibodies and peptides for FLAG purification and detection were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Purification of IgG from patient serum was performed using MAbTrap kit from Amersham (Little Chalfont, UK).

Cell Culture–Derived Hepatitis C Virus Production, Infection, and Neutralization

Plasmids for cell culture–derived HCV (HCVcc) production of Jc1 (J6:JFH1 chimera), Jc1 chimera with luciferase reporter (Luc-Jc1), Jc1E2FLAG (all genotype 2a/2a), H77R2a (genotype

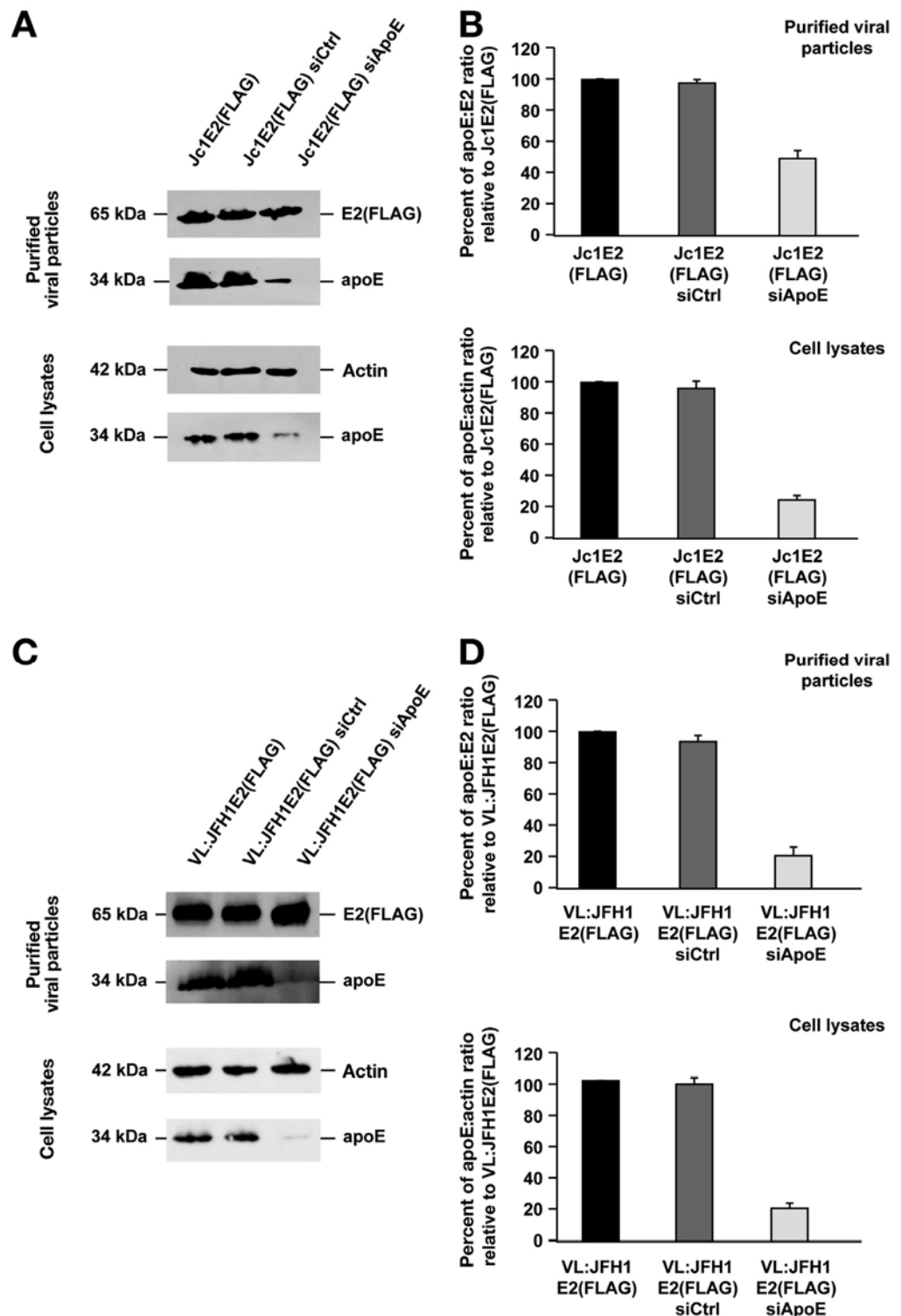


Figure 3. Silencing of apoE expression in HCV producer cells alters apoE content in immunopurified virions. Huh7.5.1 cells were electroporated with Jc1E2(FLAG) or VL:JFH1E2(FLAG) RNA alone, or co-electroporated with either scrambled siRNA (siCtrl) or siRNA targeting apoE mRNA (siApoE) and FLAG-tagged viruses were immunopurified using an anti-FLAG antibody. (A, C) Purified FLAG-tagged virions were subjected to immunoblot using FLAG- and apoE-specific antibodies (upper panels). ApoE knockdown in HCV producer cells was confirmed 72 hours post-electroporation by immunoblotting; actin was detected as loading control (lower panels). (B, D) relative quantities of apoE, E2(FLAG)-tagged virion and actin were determined as described in Materials and Methods. Results are expressed as percentage of apoE:E2 ratio relative to control virus. Means \pm SEM from 3 experiments are shown.

1a/2a), VL:JFH1, and VL:JFH1FLAG (genotype 1b/2a) have been described previously.^{6,9,20-22} HCVcc were produced in Huh7.5.1 as described previously.²⁰ Infectivity was quantified by luciferase activity or tissue culture infectious dose 50% using anti-NS5A antibody.²³ HCVcc neutralization using patient serum, IgG, and mAbs was analyzed as described previously.⁶

Silencing of Apolipoproteins in Hepatitis C Virus Producer Cells

Silencing of apoE and apoB expression and immunoblotting in Huh7.5.1 cells were performed as described previously.²⁴ Huh7.5.1 cells were either electroporated with HCV RNA co-electroporated with 200 pmol of either scrambled siRNA

BASIC AND TRANSLATIONAL LIVER

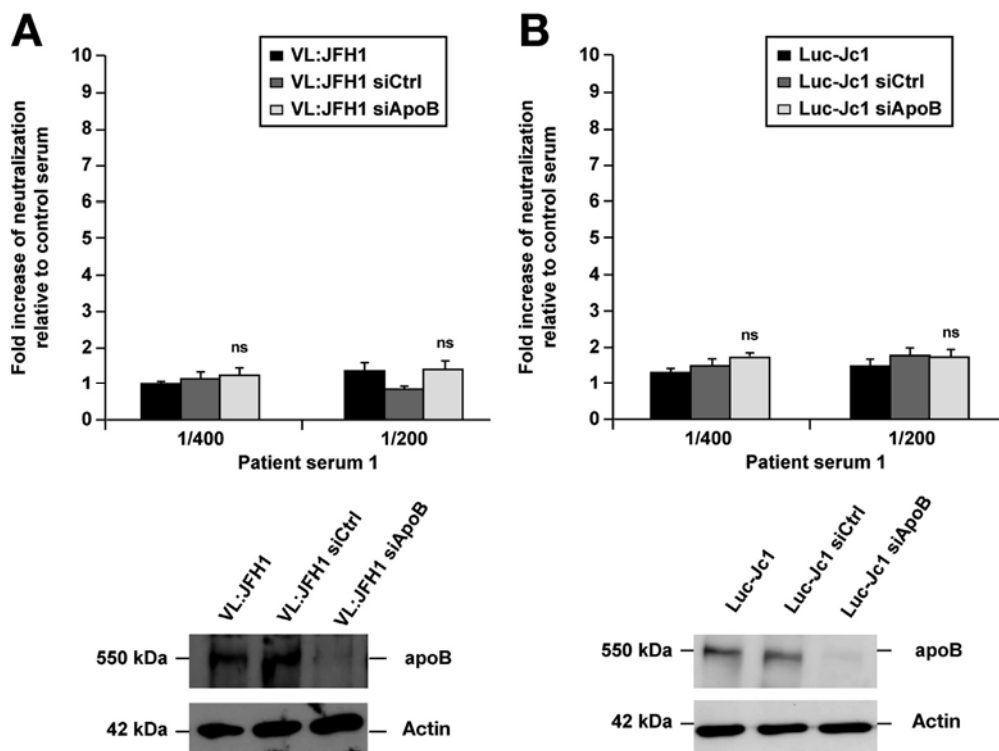


Figure 4. Depletion of apoB in HCV producer cells has no effect on HCV neutralization. Huh7.5.1 cells were either electroporated with VL:JFH1 or Luc-Jc1 RNA alone, or co-electroporated with either scrambled siRNA (siCtrl) or siRNA targeting apoB mRNA (siApoB). Neutralization experiments on viruses produced from these cells were performed using patient serum 1 at the indicated dilutions. Infection was determined by (A) end-point dilution assay, and (B) quantification of luciferase activity. Results are expressed as fold increase of neutralization relative to control serum. ApoB knockdown was confirmed 72 hours post electroporation by immunoblotting (lower panel); actin was detected as loading control. Means \pm SEM from 3 experiments are shown.

(siCtrl) or siRNA targeting apoE messenger RNA (mRNA) (siApoE) or apoB mRNA (siApoB) according to the manufacturer's instructions. Supernatants and cells were harvested 72 hours post electroporation. Protein expression was analyzed by immunoblotting as described previously.²⁴

Recombinant Adenoviruses and Rescue of Gene Silencing

The recombinant adenoviral genomes were generated as described previously.²⁵ Recombinant adenoviruses Ad-apoE were generated by transfection of these plasmids into the 293T packaging cell line after *PacI* digestion.²⁵ Huh7.5.1 cells were electroporated with HCV RNA and siApoE or a scrambled siRNA (siCtrl). Twenty-four hours post electroporation, cells were transduced with adenoviruses expressing apoE. After 72 hours, viruses were harvested and tested in neutralization experiments and both silencing and rescue of protein expression was confirmed by immunoblotting.

Generation and Purification of E2-FLAG Tagged Viruses

The VL:JFH1 derivatives encoding a E2(FLAG) fusion protein were generated using overlap polymerase chain reaction (PCR) with 2 sets of primers: S_E1_AgeI_Con1 (5'ATAGTGGTCTGCGGAACCGGT3') and A_E1_FLAG (5'CCCTT GTCATCGTCGTCTTGTAGTCCCGTCAACGCCGGCAAAA3'); S_E1_FLAG (5'GGACGACGATGACAAGGGATCAGGAGCATCCACCTACA

CGACGGGGG3'); and A_E2_AleI (5'TGTATGGATAGTCAACCAT3'). Amplicons were amplified by PCR from VL:JFH1 derivatives (VL:JFH1 or F447L or F447A), then combined by overlap PCR using S_E1_AgeI_Con1 and A_E2_AleI before insertion of the resulting fragments into the VL:JFH1 construct. E2(FLAG) encoding HCV viruses were purified using anti-FLAG M2 affinity gel, as described previously.⁹ Virion-associated apoE was detected by immunoblotting using mouse anti-apoE mAb (ab8226; Abcam), while virion E2(FLAG) was detected by anti-FLAG M2 mAb (Sigma-Aldrich). Quantification of apoE, E2(FLAG), and actin protein expression was analyzed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Quantification of Hepatitis C Virus Particle Buoyant Density Distribution

VL:JFH1 HCVcc virus was concentrated 10-fold using a Vivaspin column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Density distributions of infectious HCVcc were determined by overlaying 0.5 mL culture media on a 5-mL, 4%–40% iodixanol step gradient, and ultracentrifuging samples for 16 hours at 40,000 rpm on a SW-55 rotor (Beckman Coulter, Brea, CA). Six hundred and twenty-five microliter fractions were carefully harvested from the top of each tube, and density was determined by weighing 0.5 mL of each fraction. Infectivity of each fraction was quantified by luciferase activity or by tissue culture infectious dose 50%.

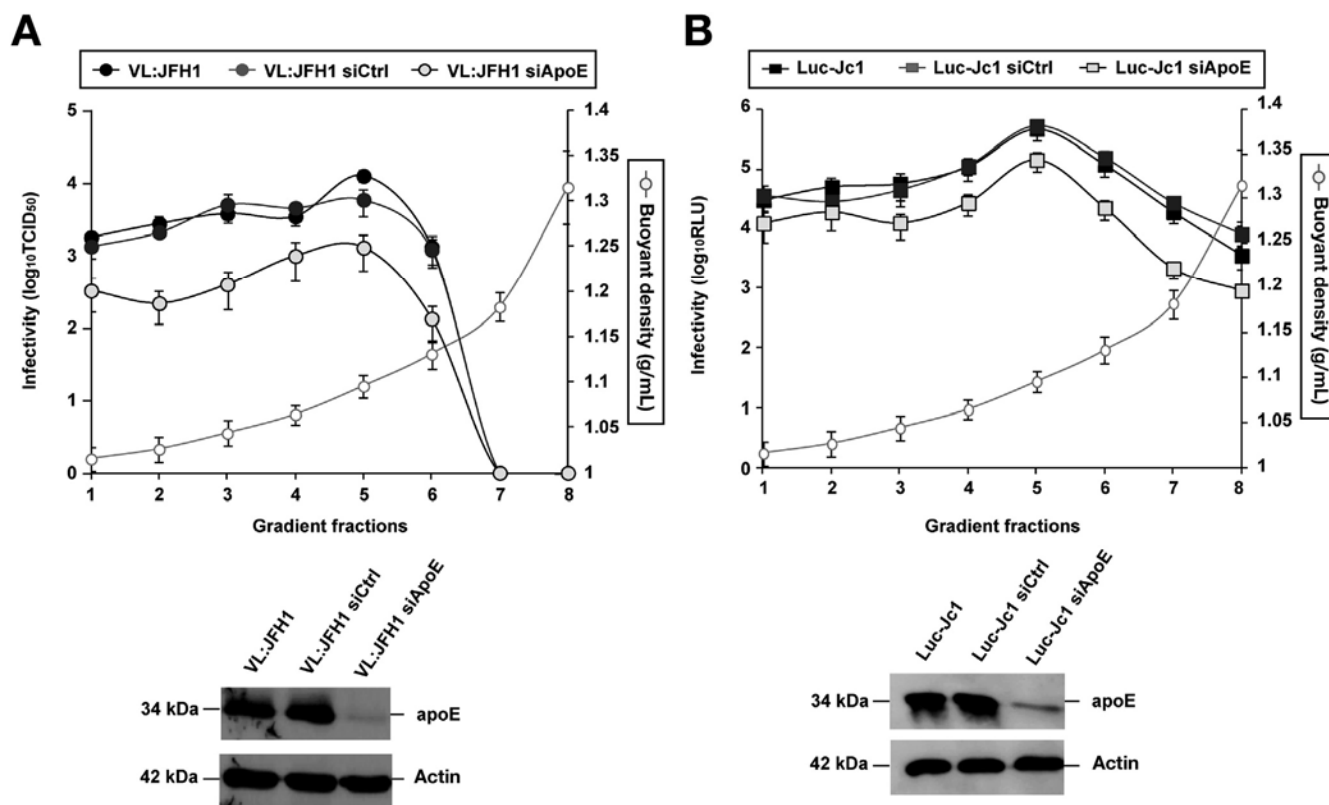


Figure 5. ApoE depletion in HCV producer cells does not modulate the buoyant density profile of virions. Huh7.5.1 cells were either electroporated with VL:JFH1 RNA or Luc-Jc1 alone (black squares and black circles, respectively), or co-electroporated with either scrambled siRNA (siCtrl) (dark gray squares and dark gray circles) or siRNA targeting apoE mRNA (siApoE) (light gray squares and light gray circles). HCVcc produced from these cells were fractionated using 4%–40% iodixanol density gradient ultracentrifugation. Each fraction was assayed for infectivity by (A) end-point dilution assay (log₁₀ tissue culture infectious dose 50%/mL) for VL:JFH1 or (B) quantification of luciferase activity (log₁₀ RLU) for Luc-Jc1. Means ± SEM from 3 experiments are shown. The light gray circles on the density plot show the mean density for each fraction and the error bars indicate the SD of the density of the respective fraction from 6 independent experiments. ApoE knockdown was confirmed 72 hours post-electroporation by immunoblotting (lower panels); actin was detected as loading control.

Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission

HCV cell-to-cell transmission was assessed as described previously.¹³ Producer Huh7.5.1 cells were electroporated with Jc1 RNA or VL:JFH1 RNA. Medium was exchanged 4 hours and again 24 hours post electroporation, and naïve target Huh7.5 green fluorescent protein cells were added concomitantly with mouse nAb AP33 (10 µg/mL) to block cell-free transmission. For analysis of the role of virus and host cell factors, cells were incubated with 10 µg/mL of either control IgG, anti-CD81 (QV-6A8-F2-C4),¹⁴ or anti-apoE (1D7)¹⁶ antibodies. Seventy-two hours post electroporation, cells were fixed with para-formaldehyde, stained with a human anti-E2 (AR3B)¹⁹ antibody and analyzed via flow cytometry.

Immunoprecipitation, RNA Extraction, and Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction

VL:JFH1 HCVcc virus was concentrated 10-fold from cell supernatants using a Vivaspin column (GE Healthcare) and immunoprecipitations were performed using Protein A/G PLUS-agarose beads according to the manufacturer instructions (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). HCV RNA from immunoprecipitated viruses was isolated using RNeasy

extraction (Qiagen, Valencia, CA) and quantified using reverse transcription quantitative PCR as described previously.^{13,24} E2-apoE co-immunoprecipitation using lysates of Huh7/LunetCD81H cells stably expressing ApoE^{WT} or ApoE^{HA} and transfected with VL:JFH1 or the 447 mutant were performed as described elsewhere.²⁶ Immunoprecipitation of apoE from Huh7.5.1 cells was performed as described previously.²⁶

Statistics

Datasets were analyzed using the Mann–Whitney test.

Results

Because apoE has been shown to be part of the HCV infectious virion mediating viral attachment, we investigated whether particle-associated apoE influences viral evasion from host nAbs. To experimentally probe this question, we used 3 different HCV strains comprising genotypes 1a, 1b, and 2a. We first studied HCV strain JFH1 carrying the structural genes of a patient-derived viral variant termed VL. We had previously shown that this genotype 1b variant is selected during liver graft infection due to envelope-mediated enhanced viral entry and broad escape from patient-derived

BASIC AND TRANSLATIONAL LIVER

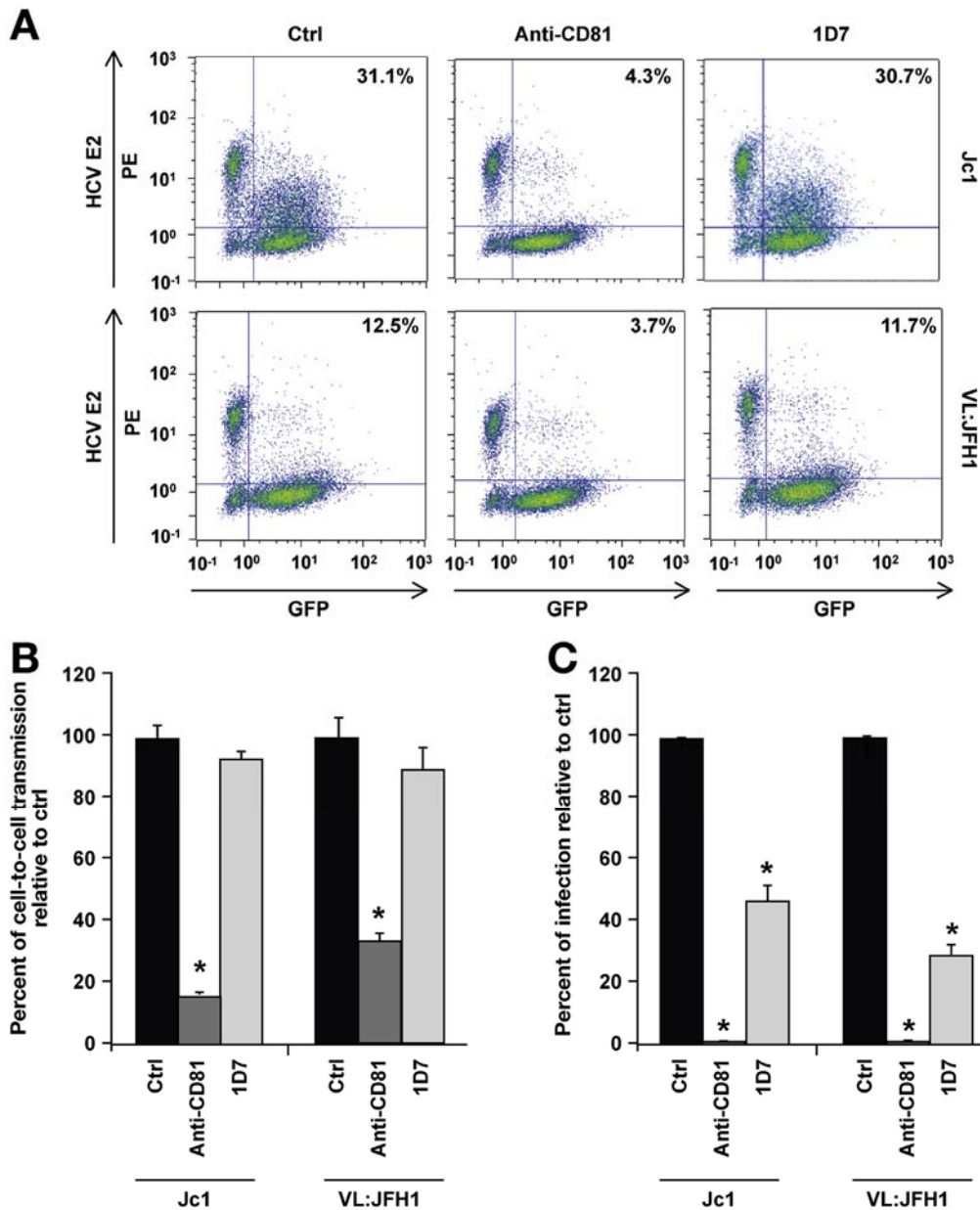


Figure 6. ApoE and cell-to-cell transmission of HCV. (A) Interference of cell-to-cell transmission of Jc1 and VL:JFH1 by anti-apoE antibody 1D7, nonspecific IgG as a negative control (Ctrl), or anti-CD81 antibody as a positive control was tested. For cell-to-cell transmission, green fluorescent protein–expressing naïve target cells were co-cultured with cells containing HCV with neutralizing mouse anti-E2 antibody AP33. Representative results of fluorescence-activated cell sorting analysis are shown. The quantity of positively stained cells for HCV E2 (y-axis), and green fluorescent protein–labeled target cells (x-axis) are represented. (B) Histograms of cell-to-cell transmission for Jc1 and VL:JFH1 summarized from 3 independent experiments performed in duplicate are shown. Values represent percentage of cell-to-cell transmission relative to control. (C) The capacity of antibodies to inhibit infection was tested by inoculation of naïve Huh7.5.1 cells with HCV in the presence of antibodies specified below the plot. Values were normalized to those obtained with nonspecific IgG (Ctrl). Means \pm SD from 3 experiments are shown. * $P < .05$.

autologous and heterologous nAbs.^{5,6} Thus, it represents a prototype variant that may be largely refractory to immunopreventive approaches or vaccines. We first generated VL:JFH1 HCVcc by cotransfecting HCV RNA alone, with a scrambled nucleotide control (siCtrl), or with siRNA that targets apoE expression (siApoE). Similar to the range reported previously,^{24,27,28} silencing of apoE expression in Huh7.5.1 producer cells resulted in a marked (50%–70%)

and significant decrease ($P < .001$) in infectivity of viruses relative to viruses with unchanged apoE expression. Exposure of VL:JFH1 HCVcc produced from apoE-depleted cells to multiple patient sera with chronic HCV infection modified these HCVcc to be highly sensitive to nAbs (Figure 1A). Depending on the patient serum and the dilution used, viruses produced from apoE-depleted cells were 4–17 times more sensitive to neutralization by patient sera than viruses from

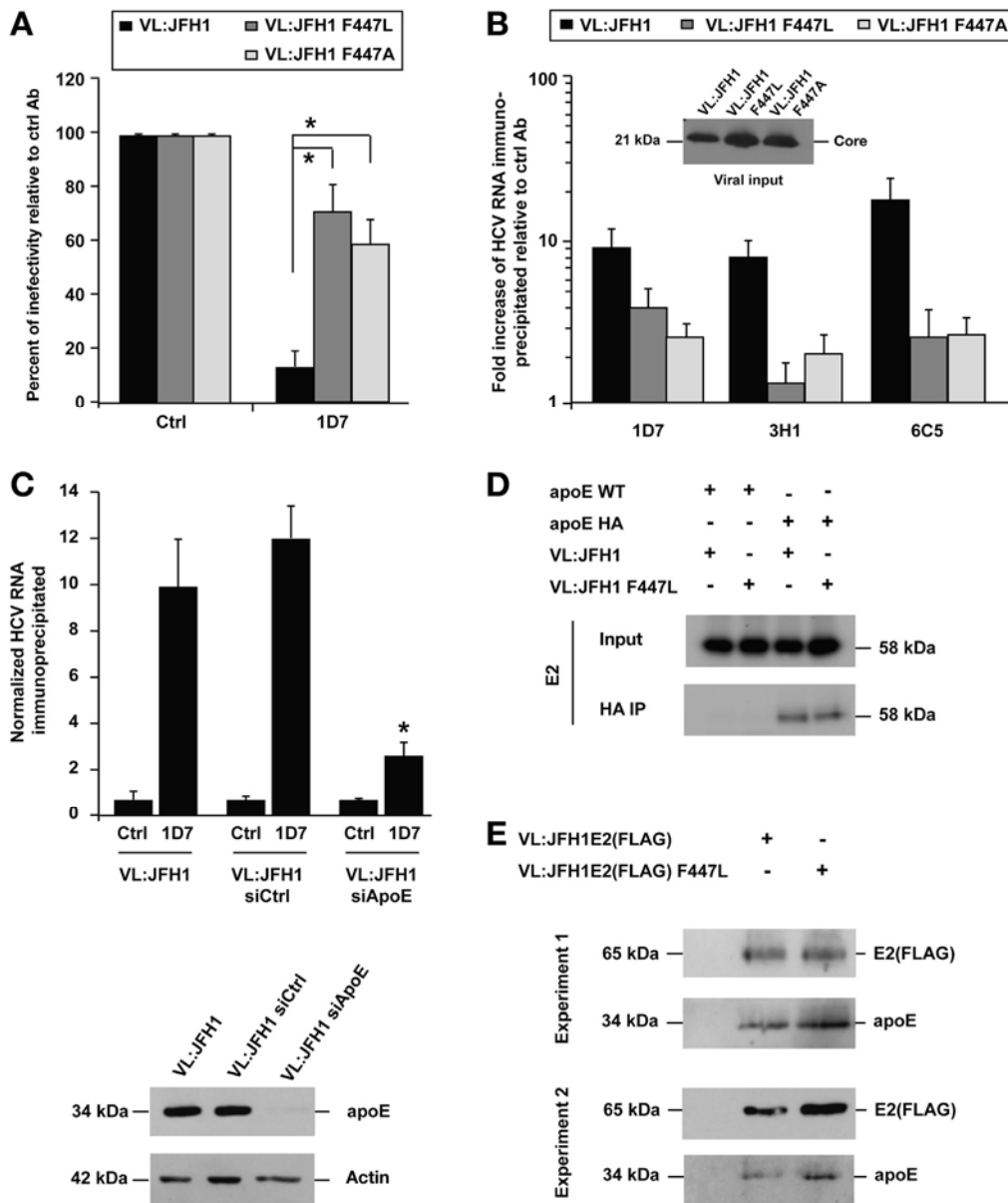


Figure 7. Envelope glycoprotein E2 residue 447 and apoE-HCV interactions. (A) Residue 447 is relevant for inhibition of HCV infection by anti-apoE antibodies. VL:JFH1 and 447 variant HCVcc were incubated with control IgG (Ctrl) or 1D7 antibody prior to infection of Huh7.5.1 cells. Infectivity was assessed by tissue culture infectious dose 50%. Results are expressed as percentage infectivity relative to Ctrl. Means \pm SEM from 4 experiments are shown. * $P < .05$. (B) Residue 447 modulates immunoprecipitation of virions by anti-apoE antibodies. VL:JFH1 and 447 mutants HCVcc were immunoprecipitated using nonspecific mouse IgG (Ctrl), or 3 different anti-apoE antibodies (1D7, 3H1, 6C5). HCV RNA was extracted from precipitates and quantified by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Results are expressed as fold increase of HCV RNA immunoprecipitated relative to control IgG. Means \pm SEMs from 2 experiments are shown. The viral input was quantified by immunoblot evaluating the amount of core protein in the culture media (*lower panel*). (C) ApoE depletion in HCV producer cells impairs immunoprecipitation of virions by anti-apoE antibody. After immunoprecipitation of virions in HCV producer cells using control IgG or anti-apoE antibody (1D7), HCV RNA was quantified by RT-qPCR. Results are expressed as normalized HCV RNA. Means \pm SEM from three experiments are shown. * $P < .01$. (D) Intracellular interaction of apoE and E2. Huh7-derived cells stably expressing ApoE^{WT} or ApoE^{HA} were electroporated with RNA genomes of VL:JFH1 or the F447L mutant and lysed 72 hours later. Immunoprecipitation was performed with a hemagglutinin-specific antibody and captured complexes were analyzed by immunoblotting using anti-E2 antibodies. To determine capture efficiency, 0.5% of total cell lysates used for immunoprecipitation were analyzed in parallel (input). One representative immunoblot is shown. (E) ApoE and E2 associations in purified virions of wild-type and mutant viruses. Virions were immunopurified from supernatants of HCV producer cells using an anti-FLAG antibody. Virion-associated proteins were analyzed by immunoblots using FLAG and apoE-specific antibodies. Results of 2 independent purifications and immunoblots are shown.

control cells with unchanged apoE expression (Figure 1A). To corroborate these findings, we studied the phenotype of 2 additional variants, H77R2a²¹ expressing the structural genes of the HCV strain H77 (genotype 1a) and J6:JFH1 prototype Luc-Jc1²⁹ expressing the structural genes of the genotype 2 HCV strain J6. Similar to findings obtained for VL:JFH1 viruses, apoE depletion resulted in enhanced sensitivity to neutralization by patient sera (Figure 1B and C). H77R2a and Luc-Jc1 viruses produced from apoE-depleted cells were 2 to 10 times and 1.5 to 2 times more sensitive to neutralization than control viruses, respectively (Figure 1B and C). Luc-Jc1 derived from apoE-deficient cells were more sensitive to nAbs regardless of their viral infectivity titers (Supplementary Figure 1). In addition, similar neutralization results were obtained upon adjustment of input virus titers between viruses produced from control and apoE-depleted cells (Supplementary Figure 2), ruling out that altered sensitivity was due to a difference in molar ratios between nAbs and HCVcc.

To further explore the role of apoE in viral evasion, we next performed trans-complementation assays using adenoviral apoE expression vectors transducing apoE knockdown cells. Ectopic apoE expression restored the HCV nAb escape to the same level as HCV produced in control cells (Figure 2A), excluding off-target effects caused by the siRNA. In addition, to determine that this observation was antibody mediated, we confirmed our results using IgG purified from sera of patients with chronic HCV infection (Figure 2B). Similar to the experiments with patient sera, we observed that Luc-Jc1 viruses produced from apoE-depleted cells were 2 times more sensitive to neutralization by purified IgG than control viruses. These findings specifically point to serum IgG and exclude other serum factors in determining the sensitivity of HCV from apoE-silenced cells (Figure 2B). In addition, we used 2 human mAbs targeting HCV E2 domain B (HC-1) or domain C (CBH-23) and tested their efficacy to neutralize viruses produced from control and apoE-silenced cells (Figure 2C). Consistent with the results obtained with patient sera and anti-HCV polyclonal IgG, we found that apoE silencing markedly (3- to 4-fold) and significantly ($P < .01$) increased sensitivity to neutralization compared with controls. These results clearly indicate that apoE plays a key role in mediating viral escape from nAbs and suggest that conformational epitopes of E2 domain B and domain C are exposed to nAbs after apoE depletion (Figure 2C).

To confirm the hypothesis that apoE modulation affected virion composition, we utilized J6-JFH1 chimera with FLAG epitope in E2 (Jc1E2[FLAG])⁹ and VL:JFH1E2(FLAG) HCVcc purified from nonassociated serum component contaminants. Immune-purification of Jc1E2(FLAG) and VL:JFH1E2(FLAG) using an antibody targeting the FLAG-tag of the virion E2 revealed that silencing of cellular apoE resulted in an approximate 50% and 80% decrease of virion-E2 associated apoE for Jc1E2(FLAG) and VL:JFH1E2(FLAG) compared with controls, respectively (Figure 3). Intracellular levels of apoE were decreased by 75% and 85%, respectively (Figure 3). Furthermore, virions produced from apoE-depleted cells appeared to have a

decreased inhibition of infection by anti-apoE antibodies (Supplementary Figure 3). These findings highlight virion-associated apoE's critical role in mediating escape from nAbs.

To test if apoB, another component of HCV, plays a role similar to apoE's in mediating escape, we silenced apoB expression in HCV-producing cells. Silencing of either apolipoprotein had no detectable effect on the level of the other apolipoprotein (Supplementary Figure 4) ensuring absence of the interfering effects of apoE/B silencing. Interestingly, while apoB knockdown was effective (Figure 4A and B), it did not alter the production of VL:JFH1 and Luc-Jc1. Furthermore, neither VL:JFH1 nor Luc-Jc1 viruses produced from apoB-silenced cells were altered in sensitivity to nAbs (Figure 4A and B). These results point directly to apoE as a key apolipoprotein mediating nAb escape and do not support a major functional role of apoB in nAb evasion.

ApoE expression is an important regulator of HCV production, and a key component of TRLs. TRL association, measured by buoyant density distribution, could shield HCV glycoproteins from nAbs.¹² Two distinct models have been proposed regarding HCV–apoE interaction and lipoviral particle formation: a 1-particle model presenting the virion inextricably fused to the lipoprotein with apoE on its surface, and a 2-particle model where HCV glycoproteins interact with apoE directly, which may mediate lipoprotein attachment.³⁰ In addition, the envelope glycoprotein, and the transmembrane domain of E2 specifically is critical for apoE association.^{26,31} If apoE protects HCV glycoproteins from nAbs directly, then our observations regarding the nAb-sensitivity of HCV generated from apoE knockdown cells will not be mediated by a marked difference in buoyant density distribution. To test this hypothesis, we analyzed the buoyant density distribution of infectious particles using isopycnic density gradient ultracentrifugation. Interestingly, the density distribution of VL:JFH1 and Luc-Jc1 was unaltered after apoE knockdown, though infectivity was diminished approximately equally in each density fraction in both VL:JFH1 and Luc-Jc1 viruses (Figure 5A and B). These data suggest that apoE knockdown does not modulate HCV-TRL association, and apoE directly associated with the virion accounts for nAb evasion.

Cell-to-cell transmission is another mechanism to avoid nAbs.³² To investigate whether apoE association is relevant in cell-to-cell transmission, we used an anti-apoE antibody (1D7) that binds the low-density lipoprotein receptor-binding domain of apoE¹⁶ and inhibits HCV infection (Figure 7A). Jc1 demonstrated an approximately 3-fold higher capacity to spread by direct cell-to-cell transmission than VL:JFH1 in this assay (Figure 6A). While 1D7 did not affect cell-to-cell spread, despite its capacity to strongly inhibit extracellular transmission, antibodies recognizing HCV entry factor CD81¹⁴ inhibited 70%–80% of cell-to-cell transmission of both Jc1 and VL:JFH1 (Figure 6A, B, and C). These data indicate that cell-cell transmission is not mediated by apoE domains targeted by anti-apoE antibody 1D7.

Recently, two studies demonstrated that apoE interacts with HCV E2.^{26,31} To define E2 domains relevant for

association with apoE and neutralization escape, we took advantage of a mutation identified in variant A (VA), a pre-transplant variant that was selected against in the same transplant recipient that contained the predominant VL variant.⁶ Indeed, replacing phenylalanine with the leucine encoded in VA rendered the virus both sensitive to neutralization and less dependent on CD81 for cell entry.⁶ To determine whether this residue is involved in the differential utilization of apoE, we used the previously described mutant restoring neutralization escape (F447L), as well as an additional mutant where phenylalanine is replaced by alanine (F447A), a smaller amino acid residue than leucine. Interestingly, the wild-type VL:JFH1 escape variant was efficiently neutralized by anti-apoE 1D7, while the 447L and 447A mutants were at least 3-fold less sensitive to neutralization by this antibody, indicating that the wild-type virus is more dependent on apoE for infection (Figure 7A). In contrast, 2 other apoE-specific antibodies (3H1 and 6C5) that bind the N- and C-terminal regions of apoE, respectively,¹⁶ did not inhibit HCV infection to the same degree (data not shown) despite their capacity to immunoprecipitate apoE from cell lysates (Supplementary Figure 5). To determine if this modulation might be due to altered apoE association with virus particles, we immunoprecipitated VL:JFH1 with either nonspecific mouse IgG or with each of the three apoE-specific antibodies 1D7, 3H1, or 6C5.¹⁶ Interestingly, all 3 anti-apoE antibodies were at least 2.5-fold more efficient at precipitating the VL:JFH1 than the 447 mutants (Figure 7B), suggesting a more robust association of the escape variant with apoE or a different E2-apoE conformation with different exposure of these epitopes on this variant. The functional relevance of apoE for immunoprecipitation of virions was confirmed by less efficient immunoprecipitation of HCV RNA by anti-apoE using VL:JFH1 and Jc1 viruses produced in apoE-depleted cells (Figure 7C and data not shown).

To investigate whether the difference in sensitivity and pull-down of VL:JFH1 447 mutants by anti-apoE antibodies was due to an altered association of apoE and virion E2 or mediated by a different conformation of the apoE-E2 complex, we performed co-immunoprecipitation analyses in cell lysates of HCV producer cells. We observed similar intracellular apoE-E2 binding in wild-type and mutant viruses (Figure 7D). Next, we determined the amount of apoE incorporated into virions by using immunopurified E2^{FLAG}-tagged viruses. We found that FLAG-tagged wild-type and F447L mutant viruses contained similar levels of apoE (Figure 7E). These data indicate that residue 447 alters the conformation of the virion E2-apoE complex without changing apoE content of the particles. Collectively, our data indicate that both the level (Figures 1–3), as well as the conformation (Figure 7) of virion apoE are relevant for the evasion from nAbs.

Discussion

Here we present experimental evidence indicating that apoE levels in HCV-producing cells determine HCV's capacity to avoid the effect of nAbs through modifying

incorporation of apoE into the viral particle. These results were obtained using structural genes from 3 different viral strains from genotypes 1a, 1b, and 2a, sera from multiple patients as well as patient-derived purified IgG and mAbs, indicating that utilization of the host factor apoE as a mechanism to escape from nAbs is pan-genotypic. While the utilization of apoE is consistently employed, it was most prominently observed in both genotype 1 variants H77 and VL, a clinically derived variant previously characterized as effective at nAb escape, highlighting that apoE "shielding" may be employed by the most difficult to neutralize variants. These differences of neutralization profiles between H77 or VL:JFH1 and Jc1 may be partially explained by a more efficient depletion of apoE in VL:JFH1 compared to Jc1 as shown in Figure 3. Alternatively, these results may point to genotype- or isolate-dependent differences in utilization of apoE and neutralization escape. Finally, the differences may be due to different cross-reactivity of the patient sera used.

We further confirmed the role of apoE through observing altered apoE:E2 ratios on purified virions after silencing (Figure 3) and trans-complementing apoE expression after knockdown, which rescued HCV's capacity to avoid inhibition of HCV entry by nAbs present in serum of chronically infected patients (Figure 2A). However, down-regulation of apoE expression did not affect HCV-TRL association (Figure 5), indicating that the apoE-mediated mechanism of nAb escape is distinct from the previously described role of TRL in escape.¹²

Using an anti-apoE antibody that blocks extracellular transmission, we did not detect a role of apoE in cell-to-cell transmission of Jc1, VL:JFH1, as well as the 2 VL:JFH1 variants (Supplementary Figure 6). This is consistent with the report from Barretto et al.³³ Engineering nonhepatic cells to produce HCV through ectopic apoE expression can confer cell-to-cell transmission capacity, albeit to a limited degree relative to the levels observed in the current study.³⁴ We thus cannot exclude that epitopes not recognized by the utilized anti-apoE antibody play a role in cell-to-cell transmission or that this antibody may have limited access to the virus during this process.

In variants that were selected during liver transplantation, replacement of phenylalanine at E2 residue 447 appeared to alter the immunoprecipitation of virions by anti-apoE antibodies (Figure 7B). Given the comparable level of intracellular E2-apoE association (Figure 7D) and apoE incorporation into virions (Figure 7E) of the wild-type and the mutant, mutations of E2 residue 447 appear to induce conformational changes in the E2-apoE complex affecting the sensitivity to neutralization by both apoE- and E2-specific nAbs (Figures 1, 2, and 7). Collectively our data indicate that virion apoE levels (Figures 1–3) and conformation (Figure 7) are relevant for the evasion from nAbs.

ApoE plays a key role in viral attachment to heparan sulfate proteoglycans,^{25,35} whereas subsequent steps of viral entry require E2-SR-BI and E2-CD81 interactions (reviewed in Zeisel et al.³⁶). Thus, dissociation of apoE and/or alteration of the apoE-E2 complex might be required for envelope-SR-BI and CD81 interactions occurring post

binding. Supporting this model, our results demonstrate that conformational human mAbs CBH-23 and HC-1, which impair HCV entry by interfering with E2–CD81 interactions and act at a post-binding step,⁶ more effectively neutralize apoE-depleted HCV.

HCV association with very-low-density lipoprotein during viral production was hypothesized to block nAbs-envelope glycoprotein binding and confer viral resistance to nAbs. Our findings point to apoE shielding of E2 from neutralization, independently from association with lipoproteins as measured by density distribution. This new role of apoE is consistent with our previous observations showing that nonhepatic cell lines lacking very-low-density lipoprotein-producing components and engineered to express apoE can sustain the entire HCV life cycle and produce viruses with buoyant density profiles similar to virus produced in hepatoma cells.³⁷

Collectively, we demonstrate that apart from lipoprotein association, apoE mediates escape from nAbs. This finding reveals a novel strategy contributing to HCV's remarkable capacity to establish chronic infection. According to the core crystal structure of E2,^{38,39} residue 447 that appears to alter the conformation of the E2-apoE complex resides on the periphery of a nonstructured E2 region and thus, would be an ideal candidate for association with exposed apoE regions. This finding might be relevant for vaccine design and we assume that immunogens that mimic epitopes at the E2/apoE interface might help to achieve a broadly neutralizing humoral immune response.

Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at www.gastrojournal.org, and at <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.014>.

References

1. Yamane D, McGivern DR, Masaki T, et al. Liver injury and disease pathogenesis in chronic hepatitis C. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;369:263–288.
2. Nabel GJ. Designing tomorrow's vaccines. *N Engl J Med* 2013;368:551–560.
3. von Hahn T, Yoon JC, Alter H, et al. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 2007;132:667–678.
4. Osburn WO, Fisher BE, Dowd KA, et al. Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* 2010;138:315–324.
5. Fafi-Kremer S, Fofana I, Soulier E, et al. Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation. *J Exp Med* 2010;207:2019–2031.
6. Fofana I, Fafi-Kremer S, Carolla P, et al. Mutations that alter use of hepatitis C virus cell entry factors mediate escape from neutralizing antibodies. *Gastroenterology* 2012;143:223–233 e9.
7. Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 2002;76:6919–6928.
8. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, et al. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 2011;19:95–103.
9. Merz A, Long G, Hiet MS, et al. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem* 2011;286:3018–3032.
10. Catanese MT, Uryu K, Kopp M, et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:9505–9510.
11. Dreux M, Boson B, Ricard-Blum S, et al. The exchangeable apolipoprotein ApoC-I promotes membrane fusion of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 2007;282:32357–32369.
12. Grove J, Nielsen S, Zhong J, et al. Identification of a residue in hepatitis C virus E2 glycoprotein that determines scavenger receptor BI and CD81 receptor dependency and sensitivity to neutralizing antibodies. *J Virol* 2008;82:12020–12029.
13. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011;17:589–595.
14. Fofana I, Xiao F, Thumann C, et al. A novel monoclonal anti-CD81 antibody produced by genetic immunization efficiently inhibits hepatitis C virus cell-cell transmission. *PLoS One* 2013;8:e64221.
15. Owsianka A, Tarr AW, Juttla VS, et al. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J Virol* 2005;79:11095–11104.
16. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW, et al. Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J Biol Chem* 1986;261:2068–2076.
17. Keck ZY, Xia J, Wang Y, et al. Human monoclonal antibodies to a novel cluster of conformational epitopes on HCV E2 with resistance to neutralization escape in a genotype 2a isolate. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002653.
18. Macdonald A, Crowder K, Street A, et al. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. *J Biol Chem* 2003;278:17775–17784.
19. Law M, Maruyama T, Lewis J, et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 2008;14:25–27.
20. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791–796.
21. Reiss S, Rebhan I, Backes P, et al. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 2011;9:32–45.

22. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, et al. Construction and characterization of infectious intra-genotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7408–7413.
23. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005;309:623–626.
24. **Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M**, et al. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* 2010;51:43–53.
25. Lefevre M, Felmlee DJ, Parnot M, et al. Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E. *PLoS One* 2014;9:e95550.
26. Lee JY, Acosta EG, Stoeck IK, et al. Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins. *J Virol* 2014;88:12422–12437.
27. **Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G**, et al. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* 2007;81:13783–13793.
28. Jiang J, Luo G. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* 2009;83:12680–12691.
29. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006;80:5308–5320.
30. Lindenbach BD, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:688–700.
31. Boyer A, Dumans A, Beaumont E, et al. The association of hepatitis C virus glycoproteins with apolipoproteins E and B early in assembly is conserved in lipoviral particles. *J Biol Chem* 2014;289:18904–18913.
32. **Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW**, et al. Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* 2011;85:596–605.
33. **Barretto N, Sainz B Jr, Hussain S**, et al. Determining the involvement and therapeutic implications of host cellular factors in hepatitis C virus cell-to-cell spread. *J Virol* 2014;88:5050–5061.
34. Hueging K, Doepke M, Vieyres G, et al. 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. *J Virol* 2014;88:1433–1446.
35. Jiang J, Cun W, Wu X, et al. Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2012;86:7256–7267.
36. Zeisel MB, Felmlee DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;369:87–112.
37. **Da Costa D, Turek M, Felmlee DJ**, et al. Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in nonhepatic cells. *J Virol* 2012;86:11919–11925.
38. Kong L, Giang E, Nieuwsma T, et al. Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science* 2013;342:1090–1094.
39. Khan AG, Whidby J, Miller MT, et al. Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature* 2014;509:381–384.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

Received September 24, 2014. Accepted September 11, 2015.

Reprint requests

Address requests for reprints to: Thomas F. Baumert, MD, Inserm Unit 1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France, e-mail: Thomas.Baumert@unistra.fr; fax: (33) 3 68 85 37 50.

Acknowledgments

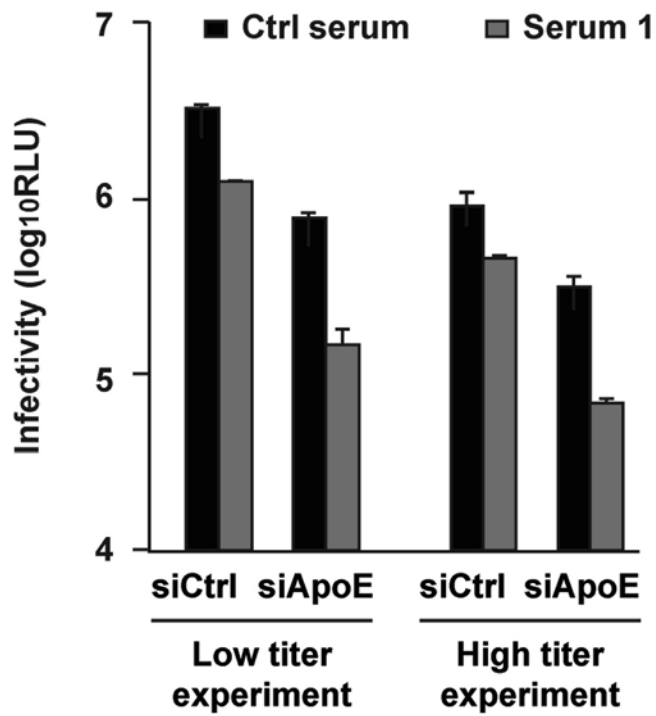
The authors thank F. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for the gift of Huh7.5.1 cells, T. Wakita (Department of Virology II, National Institutes of Health, Tokyo, Japan) and C. M. Rice (Rockefeller University, New York, NY) for providing HCV strain JFH1, M. Harris (University of Leeds, Leeds, UK), for the gift of the sheep anti-NS5A serum, C. M. Rice (Rockefeller University) for Huh7.5-derived cells, and M. Law (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for anti-E2 AR3B antibody. The authors thank S. Fafi-Kremer and F. Stoll-Keller (Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires Strasbourg) for support and discussions during the early phase of the study and J. Boileau (Hôpitaux Universitaires Strasbourg) for providing serum samples.

Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts.

Funding

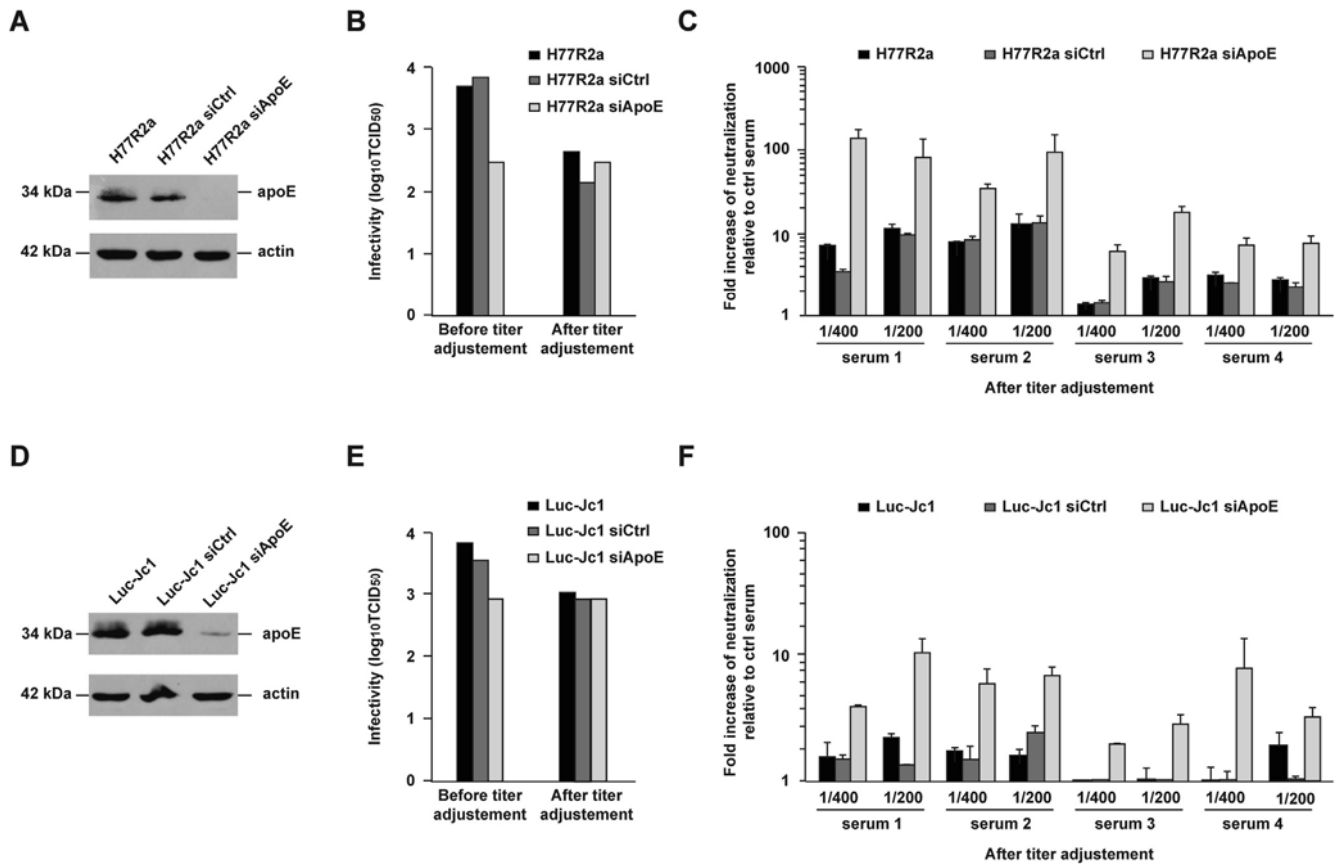
This study was supported through funding by the European Union (ERC-2008-AdG-233130-HEPCENT, FP7 HepaMAb and Interreg-IV-Rhin Supérieur-FEDER-Hepato-Regio-Net 2012), the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) (2012/239, 2012/318, 2013/108), the Direction Générale de l'Offre de Soins (A12027MS) and the University of Strasbourg Foundation. This work has been published under the framework of the LABEX ANR-10-LABX-0028_HEPSYS and benefits from funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the Investments for the future program. D. J. Felmlee acknowledges fellowships from European Association for Study of the Liver (EASL) and ANRS, E. Crouchet a PhD student acknowledges a MRT fellowship from the French Ministry for Education, R. Bartenschlager was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, FOR1202, TP1. P. Meuleman was supported by the Research Foundation Flanders (FWO project #3G052112), the Ghent University (GOA #01G01712) and the Belgian state (IUAP P7/47-HEPRO2). C. Schuster acknowledges funding by ANRS (2010-307/2011-415) and IdEx University of Strasbourg.



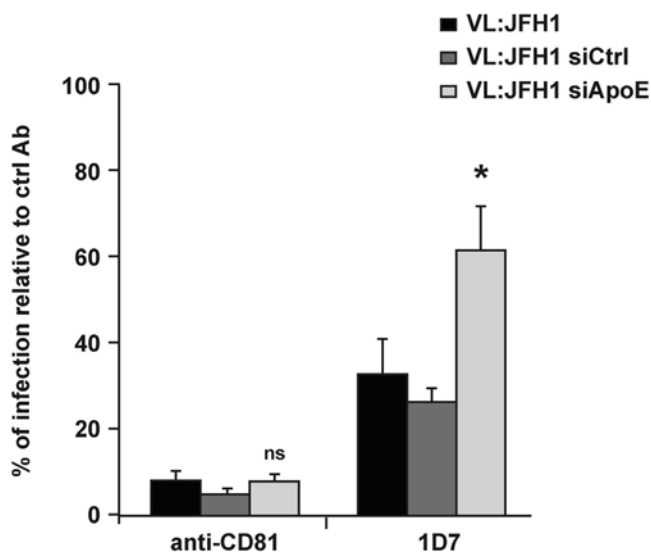
Supplementary Figure 1. Increased nAb sensitivity of apoE-depleted HCV is not due to decreased virus quantity or the ratio of infectious virions and nAbs. Huh7.5.1 cells were electroporated with Luc-Jc1 RNA alone, or co-electroporated with either scrambled siRNA (siCtrl) or siRNA targeting apoE mRNA (siApoE). Two experiments using different HCV viral titers (high viral titer vs low viral titer) were performed to study the impact of virus quantity on the sensitivity to patient serum. Results of neutralization assay of HCV produced from these cells using serum from a patient without HCV infection (Ctrl) or indicated dilution of serum from a patient with genotype 1 HCV infection was determined by quantification of luciferase activity (log₁₀ RLU). Means ± SEM of both experiments performed in triplicate are shown.

January 2016

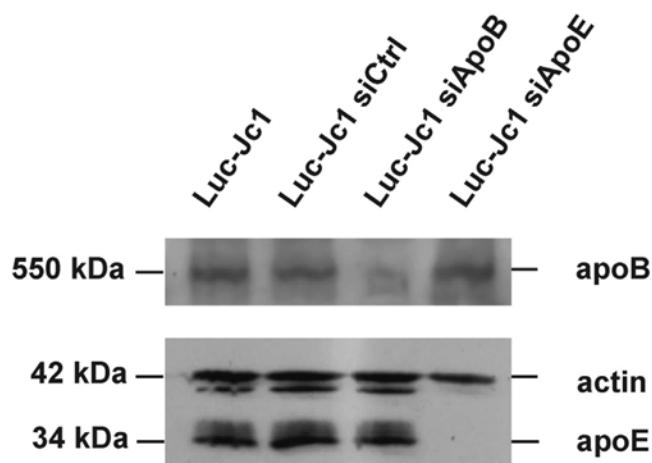
ApoE Protects HCV From nAbs 217.e2



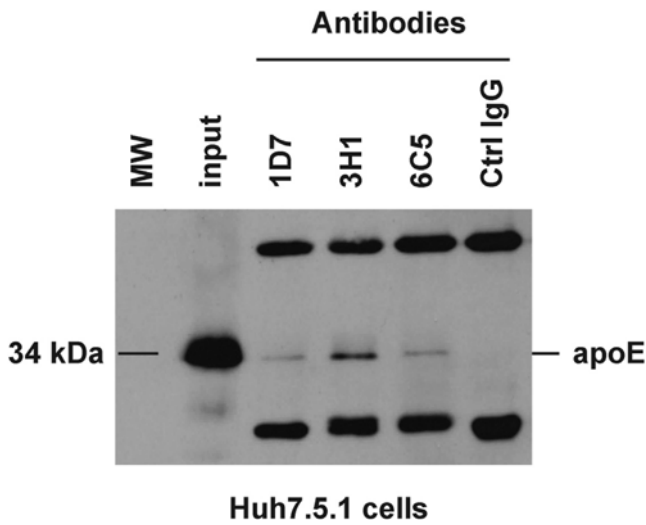
Supplementary Figure 2. Adjustment of input virus titers of viruses produced from control and apoE-depleted cells confirms association of virion apoE content and sensitivity to antibody-mediated neutralization. Huh7.5.1 cells were electroporated with H77R2a (A–C) or Luc-Jc1 (D–F) RNA alone, or co-electroporated with either scrambled siRNA (siCtrl) or siRNA targeting apoE mRNA (siApoE). (A, D). ApoE depletion in producer cells was confirmed 72 hours post electroporation by immunoblotting of cell lysates; actin was detected as loading control (*right panels*). (B, E) Titers of viruses produced in supernatants of transfected Huh7.5.1 cells (72 hours post electroporation) were determined by tissue culture infectious dose 50% (TCID₅₀) using infection of naive Huh7.5.1 cells (72 hours post electroporation) as described in the Materials and Methods. After quantification of viral titers, titers were adjusted by dilution in cell culture medium. Titers of viruses from apoE-depleted cells served as the reference. Viral titers before and after dilution are shown as TCID₅₀ of a representative titration analysis. (C, F) Neutralization experiments using viruses with adjusted titers shown in (B, E) were performed using sera from 4 different HCV-infected patients (1, 2, 3 or 4) as described in Figure 1. Means ± SDs from one representative experiment performed in duplicate are shown. Results are expressed as fold increase of neutralization relative to control serum.



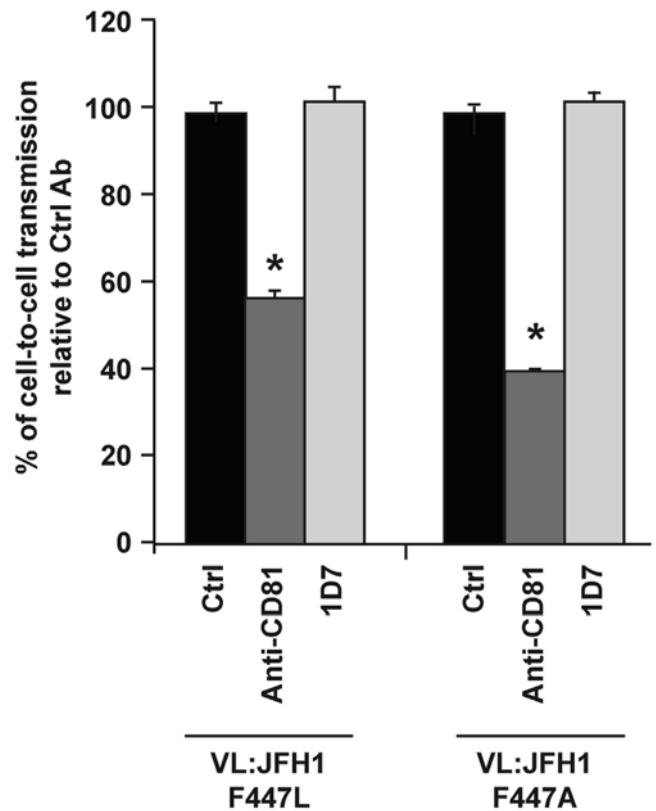
Supplementary Figure 3. Inhibition of viruses produced from apoE-silenced producer cells by anti-apoE or anti-CD81 antibodies. Huh7.5.1 cells were electroporated with VL:JFH1 alone, or co-electroporated with either scrambled siRNA (siCtrl) or siRNA targeting apoE mRNA (siApoE). To assess the role of CD81, cells were pretreated with 10 μ g/mL anti-CD81 antibody for 30 minutes before HCVcc infection of Huh7.5.1 cells. To assess the role of apoE, HCVcc were preincubated with 10 μ g/mL anti-apoE antibody (1D7) for 1 hour before infection of Huh7.5.1 cells. Infection was determined by end-point dilution assay and expressed as percentage of infection relative to control antibodies. Means \pm SEM from 4 independent experiments are shown. $P < .05$.



Supplementary Figure 4. Silencing of apoE expression in HCV producer cells has no effect on apoB expression and vice versa. Huh7.5.1 cells were electroporated with Luc-Jc1 RNA alone, or co-electroporated with either scrambled siRNA (siCtrl) or siRNA targeting either apoE mRNA (siApoE) or apoB mRNA (siApoB). After 72 hours, apoB and apoE expression was quantified using immunoblots of cell lysates and anti-apoE and apoB specific antibodies; actin expression was analyzed as control. A representative immunoblot is shown.



Supplementary Figure 5. Immunoprecipitation of apoE using anti-apoE antibodies 1D7, 3H1 and 6C5 in Huh7.5.1 cell lysates. ApoE was immunoprecipitated from cell lysates as described in Materials and Methods and apoE on immunoprecipitated beads was subjected to immunoblot using anti-apoE antibody (Abcam). Isotype IgG served as negative control for immunoprecipitation. Two independent experiments have been performed. A representative immunoblot is shown.



Supplementary Figure 6. Absent effect of anti-apoE antibody 1D7 on the cell-to-cell transmission of VL:JFH1 F447L and F447A mutants. Interference of cell-to-cell transmission of VL:JFH1 F447L and F447A by anti-apoE antibody 1D7, nonspecific IgG as a negative control (Ctrl), or anti-CD81 antibody as a positive control was tested. For cell-to-cell transmission, green fluorescent protein-expressing naïve target cells were co-cultured with cells containing HCV with neutralizing antibody AP33. Histograms of cell-to-cell transmission summarized from 2 independent experiments performed in duplicate are shown. Values represent percentage of cell-to-cell transmission relative to control. $P < .05$.

III. Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous avons mis en évidence un nouveau rôle d'apoE dans la pathogenèse du HCV. En effet, nous avons démontré qu'apoE contribue à l'échappement du HCV aux nAbs, en masquant les épitopes de la glycoprotéine d'enveloppe E2.

ApoE masque les épitopes ciblés par les nAbs en s'associant à E2

Nous avons démontré que le *silencing* d'apoE dans les cellules répliquant HCV induit la formation de particules virales portant moins d'apoE à leur surface. Ces particules sont à la fois beaucoup moins infectieuses et plus sensibles à la neutralisation par les nAbs que les particules virales contrôles. Ce résultat a été observé pour toutes les souches virales utilisées dans cette étude (1a, 1b, 2a), démontrant un mécanisme pangénotypique. De plus, la déplétion d'apoE permet également d'obtenir un profil sensible aux nAbs pour le variant VL, possédant une forte capacité d'échappement aux nAbs chez les patients infectés (Schvoerer *et al.*, 2007 ; Fafi-Kremer *et al.*, 2010). Les épitopes ciblés par les nAbs sont majoritairement situés dans les régions hypervariables HVR1 et HVR2 de la glycoprotéine E2. Deux études récentes ont de plus démontré qu'apoE interagissait directement avec E2 (Boyer *et al.*, 2014 ; Lee *et al.*, 2014). Au vu de nos résultats, nous proposons qu'en interagissant avec E2, apoE masque les épitopes ciblés par les nAbs. Une déplétion d'apoE à la surface des particules virales restaure donc une sensibilité des virions aux nAbs.

Les régions HVR peuvent varier jusqu'à 80% entre les différents génotypes et sous-types du HCV. Par conséquent, les nAbs ciblant ces régions n'ont que rarement une activité neutralisante croisée (Von Hahn *et al.*, 2007 ; Prentoe *et al.*, 2011 ; Vieyres *et al.*, 2011). Or, les particules virales produites au cours de cette étude possédant peu d'apoE à leur surface, sont efficacement neutralisées par les nAbs issus de différents patients, infectés par une même souche virale, ou par une souche différente. Au vu de nos résultats, il est probable que la déplétion d'apoE permette de démasquer des épitopes plus conservés ciblés par les nAbs, comme par exemple les épitopes situés sur le domaine de liaison au CD81 (Keck *et al.*, 2008 ; Law *et al.*, 2008). En accord avec ces études, nous avons démontré que les anticorps CBH-23 et HC-1, ciblant l'interaction E2-CD81, neutralisent plus efficacement les particules virales déplétées d'apoE que les particules virales contrôles. Plusieurs études ont montré que les virus mutants délétés des régions HVR sont beaucoup plus sensibles aux nAbs que les virus sauvages. Les régions HVR, comme leur nom l'indique, sont très variables et contribuent à l'échappement aux nAbs. Ces études

suggèrent donc que les régions HVR jouent un rôle de leurre pour le système immunitaire en masquant les épitopes plus conservés qui seraient efficacement reconnus par les nAbs (Forns *et al.*, 2000 ; Mondelli *et al.*, 2001 ; Prentoe *et al.*, 2011). Cette observation a été appuyée par une étude très récente démontrant que les anticorps ciblant la région HVR1 d'E2 empêchaient la fixation de nAbs ciblant des régions plus conservées (Keck *et al.*, 2016). Au vu de ces travaux et de nos résultats, il est plus que probable que l'association entre apoE et E2 permette de masquer les régions conservées et au contraire, d'exposer les régions HVR pour leurrer le système immunitaire. Cette hypothèse est confortée par le fait qu'au cours de l'entrée virale, un changement de conformation d'E2 est nécessaire après la liaison de SR-BI aux régions HVR1 d'E2 pour démasquer les sites de liaison au CD81, très conservés et sensibles aux nAbs (Scarselli *et al.*, 2002 ; Dao *et al.*, 2012).

Des résidus spécifiques de la glycoprotéine E2 du variant VL permet l'échappement aux nAbs

En 2012, une étude réalisée dans notre laboratoire a démontré que le variant VL portait des mutations de certains des résidus de la glycoprotéine E2, responsables de la forte capacité d'échappement aux nAbs de ce variant. En effet, les résidus 447, 458 et 478 ont été incriminés (Fofana *et al.*, 2012). En accord avec le modèle proposé en 2010 par Krey *et al.* et les données plus récentes sur la structure d'E2 (Krey *et al.*, 2010 ; Kong *et al.*, 2013 ; Khan *et al.*, 2014), ces résidus se trouvent à proximité des domaines de liaison connus au CD81 (Fofana *et al.*, 2012). Il a été démontré que la mutation de ces résidus affecte les capacités de liaison d'E2 au CD81. Cette étude a donc identifié des mutations dans la structure d'E2 issue du variant VL, qui permettent au virus d'échapper aux nAbs et d'entrer plus efficacement dans les hépatocytes en modulant l'utilisation du CD81.

Dans notre étude, nous avons réalisé des substitutions du résidu Phe447 de la glycoprotéine E2 par une alanine ou une leucine. Nous avons observé que les variants VL mutants sont moins sensibles à la neutralisation par des anticorps dirigés contre apoE que les variants sauvages. De plus, nous avons observé que les quantités d'apoE et d'E2 étaient comparables entre les variants mutants et sauvages. Au vu de ces résultats, nous proposons que la mutation du résidu 447 induit un changement de conformation d'E2 et une moins bonne association avec apoE à la surface de la particule virale. L'association apoE-E2 est donc dépendante du résidu 447. La forte capacité d'échappement aux nAbs du variant VL peut donc s'expliquer par une meilleure association d'E2 avec apoE par rapport aux variants non sélectionnés durant la TH. Tout comme pour l'utilisation du CD81, le variant

VL s'est adapté à apoE pour améliorer sa dissémination dans les hépatocytes. Pour aller plus loin dans cette étude, il serait intéressant de comparer l'association d'apoE avec les glycoprotéines E2 des variants sélectionnés par rapport aux variants non sélectionnés durant la TH.

Adaptation du HCV aux facteurs de l'hôte

Il a été démontré que les LVP étaient considérablement enrichies en apoE par rapport aux VLDL. En effet, alors que les VLDL ne contiennent qu'environ 5 à 7 molécules d'apoE par particule, les LVP en contiennent près de 300 (Tomiyasu *et al.*, 2001 ; Merz *et al.*, 2011). Il est ainsi probable que le virus ait détourné les fonctions d'apoE au sein de la lipoprotéine et se soit adapté à l'hôte en limitant sa reconnaissance par le système immunitaire. Un tel mécanisme a été décrit en 2013 pour un autre virus hépatotrope, le HAV. Le HAV est un virus non enveloppé. Cependant, il semblerait que ce virus ait acquis la capacité d'utiliser des composants membranaires de la cellule pour former ses propres particules virales, afin d'échapper à la reconnaissance par les nAbs (Feng *et al.*, 2013). La coévolution de l'utilisation des facteurs de l'hôte comme le CD81 et apoE ainsi que l'échappement aux nAbs a également permis au variant VL d'optimiser l'infection des hépatocytes et de favoriser sa persistance. Ce mécanisme joue probablement un rôle important dans l'échappement viral au système immunitaire cours de la TH.

Perspectives : implications pour les stratégies vaccinales et l'immunothérapie

La découverte des interactions apoE-E2 dans l'échappement aux nAbs a des implications majeures à la fois pour la compréhension de la pathogenèse virale et pour le développement d'immunothérapies et de stratégies vaccinales futures. En effet, le développement de plusieurs vaccins repose sur la production efficace de nAbs. Deux publications récentes ont démontré que l'immunisation d'animaux par des pseudoparticules portant les glycoprotéines du HCV à leur surface ou des HCVcc inactivées permet une forte production de nAbs chez la souris et le macaque. Les nAbs issus de ces animaux permettent une neutralisation croisée de plusieurs génotypes viraux *in vitro* (Garrone *et al.*, 2011 ; Akazawa *et al.*, 2013). Cependant, la conformation des glycoprotéines présentes à la surface des pseudoparticules ou des HCVcc peut s'avérer différente de celles observée pour les LVP produites dans l'organisme, due d'une part, à l'absence d'association aux lipoprotéines pour les pseudoparticules, et d'autre part, à l'association à des particules *VLDL-like* en culture cellulaire pour les HCVcc (Ball *et al.*,

2014). L'efficacité des nAbs, issus de l'immunisation par les HCVpp ou HCVcc, à neutraliser des LVP *in vivo* doit encore être évaluée.

L'immunisation par les glycoprotéines E1 et E2 a également été envisagée comme une stratégie vaccinale intéressante pour induire la production de nAbs. En effet, il a été démontré que la vaccination de volontaires sains par E1 et E2 permettait la production de nAbs (Law *et al.*, 2013). Cependant, l'efficacité de ces nAbs a été testée *in vitro* sur des virus produits en culture cellulaire. Leur capacité à prévenir une infection par HCV *in vivo* doit encore être évaluée. De plus, la production de glycoprotéines correctement repliées *in vitro* s'avère difficile et nécessite plusieurs protéines chaperonnes (Khan *et al.*, 2015). Les glycoprotéines doivent également subir plusieurs maturations et glycosylations pour être fonctionnelles. Par conséquent, la structure des protéines exprimées en contexte non viral sont différentes des glycoprotéines retrouvées à la surface des LVP naturelles (Cocquerel *et al.*, 2002 ; Voisset et Dubuisson, 2004).

Pour le développement d'un vaccin efficace, il faudrait donc tenir compte des interactions entre les glycoprotéines virales et les composants des LVP. Notre étude a permis une meilleure compréhension de ces interactions en démontrant l'importance des interactions entre apoE et E2 dans l'échappement aux nAbs. Il serait donc intéressant d'approfondir nos connaissances sur les interactions entre apoE et E2 au sein de la LVP pour le développement d'une nouvelle stratégie vaccinale. En effet, il serait intéressant de développer des peptides dérivés d'E2 couvrant les zones d'interactions avec apoE. L'immunisation d'animaux avec ces peptides permettrait d'obtenir des anticorps capables de reconnaître l'interaction E2-apoE dans la LVP. De plus, comme l'association d'E2 avec apoE semble conservée parmi les géotypes et sous-types viraux, ces anticorps pourraient avoir une activité neutralisante croisée. Enfin, plusieurs études ont démontré que l'administration passive d'anticorps polyclonaux ou de nAbs dirigés contre HCV prévenait l'infection par HCV dans un modèle murin (Law *et al.*, 2008 ; Meuleman *et al.*, 2011). L'utilisation de nAbs peut donc s'avérer utile lors de la TH. Ainsi, les peptides dérivés d'E2 pourraient être utilisés pour produire des nAbs à grande échelle afin de traiter les patients subissant une TH pour éviter la réinfection du greffon.

Pour conclure, nous avons mis en évidence un nouveau rôle d'apoE dans l'échappement du HCV au nAbs. Cette découverte et la caractérisation des interactions entre apoE et le virus au sein de la LVP pourraient, à long terme, permettre l'élaboration de nouvelles stratégies vaccinales.

CONCLUSION GENERALE

ApoE : Docteur Jekyll ou Mister Hyde ?

En conclusion, mon travail de thèse a permis d'élargir les connaissances sur le rôle d'apoE, au cours du cycle viral, du métabolisme lipidique et de la pathogenèse du HCV.

Dans notre première étude, nous avons pu mettre en évidence que l'apoE libre inhibe la réplication virale grâce à son rôle régulateur du métabolisme lipidique. En effet, nous avons démontré qu'apoE libre extracellulaire induit un efflux de cholestérol ABCG1-dépendant afin de promouvoir la synthèse d'HDL, diminuant ainsi la quantité de cholestérol intracellulaire disponible pour la réplication virale.

Dans une seconde étude, nous avons mis en évidence qu'en plus d'être impliquée dans l'infection des hépatocytes et la production de particules virales infectieuses, apoE participait à l'échappement du virus au système immunitaire en masquant les épitopes de la glycoprotéine E2 reconnus par les nAbs.

Ces deux études montrent que les deux formes de la protéine, liée et libre possèdent des rôles opposés au sein du cycle viral du HCV. D'une part, l'apoE libre extracellulaire (Docteur Jekyll) contrôle la réplication du virus et peut éviter sa dissémination. Cependant, les propriétés de la forme libre pourraient être détournée par le virus pour favoriser la chronicité de l'infection (Mister Hyde). D'autre part, les propriétés physiologiques d'apoE liée aux lipoprotéines (Docteur Jekyll) ont été mises à profit par le virus pour favoriser sa dissémination. En effet, l'apoE associée à la LVP (Mister Hyde) promeut le cycle viral et la pathogenèse. Ces études permettent de clore un nouveau chapitre sur la compréhension des relations entre HCV et sa cellule hôte, démontrant le détournement astucieux des facteurs cellulaires par le virus. Ces travaux contribueront peut être à l'avenir à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abdel-Ghaffar, T.Y., Sira, M.M., and Naghi, S. El (2015) Hepatitis C genotype 4: The past, present, and future. *World J Hepatol***7**: 2792–2810.

Adair, R., Patel, A.H., Corless, L., Griffin, S., Rowlands, D.J., and 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.

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

Aizaki, H., Lee, K.-J., Sung, V.M.-H., Ishiko, H., and Lai, M.M.C. (2004) Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology***324**: 450–461.

Aizawa, Y., Seki, N., Nagano, T., and Abe, H. (2015) Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. *World J. Gastroenterol.***21**: 10299–10313.

Akazawa, D., Moriyama, M., Yokokawa, H., Omi, N., Watanabe, N., Date, T., et al. (2013) Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology***145**: 447–455.e1–4.

Alatrakchi, N. and Koziel, M. (2009) Regulatory T cells and viral liver disease. *J. Viral Hepat.***16**: 223–229.

Albecka, A., Belouzard, S., Beeck, A. Op de, Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., et al. (2012) Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology***55**: 998–1007.

Ali, K., Lund-Katz, S., Lawson, J., Phillips, M.C., and Rader, D.J. (2008) Structure-function properties of the apoE-dependent COX-2 pathway in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis***196**: 201–209.

Alter, H.J., Purcell, R.H., Holland, P.V., and Popper, H. (1978) Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet***1**: 459–463.

Amako, Y., Sarkeshik, A., Hotta, H., Yates, J., and Siddiqui, A. (2009) Role of Oxysterol Binding Protein in Hepatitis C Virus infection. *J Virol***83**: 9237–9246.

Amako, Y., Tsukiyama-Kohara, K., Katsume, A., Hirata, Y., Sekiguchi, S., Tobita, Y., et al. (2010) Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J. Virol.***84**: 303–311.

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

Anggakusuma, Romero-Brey, I., Berger, C., Colpitts, C.C., Boldanova, T., Engelmann, M., et al. (2015) Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase restricts hepatitis C virus replication through blockage of membranous web formation. *Hepatology***62**: 702–714.

Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., et al. (2008) Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.***4**: e1000035.

Arai, T., Rinninger, F., Varban, L., Fairchild-Huntress, V., Liang, C.P., Chen, W., et al. (1999) Decreased selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in apolipoprotein E knock-out mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***96**: 12050–12055.

Ariumi, Y., Kuroki, M., Maki, M., Ikeda, M., Dansako, H., Wakita, T., and Kato, N. (2011) The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS ONE***6**: e14517.

Arnaud, N., Dabo, S., Akazawa, D., Fukasawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Hugon, J., et al. (2011) Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog.***7**: e1002289.

Asselah, T., Boyer, N., Saadoun, D., Martinot-Peignoux, M., and Marcellin, P. (2016) Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFN-free treatment and future perspectives. *Liver Int***36**: 47–57.

B

Bai, Y., Zhou, K., and Doudna, J.A. (2013) Hepatitis C virus 3'UTR regulates viral translation through direct interactions with the host translation machinery. *Nucleic Acids Res***41**: 7861–7874.

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

Bartenschlager, R. (2006) Hepatitis C virus molecular clones: from cDNA to infectious virus particles in cell culture. *Curr. Opin. Microbiol.***9**: 416–422.

Bartenschlager, R., Lohmann, V., and Penin, F. (2013) The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Micro***11**: 482–496.

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

Barth, H., Liang, T.J., and Baumert, T.F. (2006) Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology***44**: 527–535.

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

Bartosch, B., Dubuisson, J., and 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., et al. (2005) An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J. Virol.***79**: 8217–8229.
- Bauhofer, O., Ruggieri, A., Schmid, B., Schirmacher, P., and Bartenschlager, R. (2012) Persistence of HCV in quiescent hepatic cells under conditions of an interferon-induced antiviral response. *Gastroenterology***143**: 429–438.e8.
- Baumert, T.F., Fauvelle, C., Chen, D.Y., and Lauer, G.M. (2014) A prophylactic hepatitis C virus vaccine: a distant peak still worth climbing. *J. Hepatol.***61**: S34–44.
- Benga, W.J.A., Krieger, S.E., Dimitrova, M., Zeisel, M.B., Parnot, M., Lupberger, J., et al. (2010) Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology***51**: 43–53.
- Beran, R.K.F., Lindenbach, B.D., and Pyle, A.M. (2009) The NS4A protein of hepatitis C virus promotes RNA-coupled ATP hydrolysis by the NS3 helicase. *J. Virol.***83**: 3268–3275.
- Berger, K.L., Kelly, S.M., Jordan, T.X., Tartell, M.A., and Randall, G. (2011) Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication. *J. Virol.***85**: 8870–8883.
- Billerbeck, E., de Jong, Y., Dorner, M., de la Fuente, C., and Ploss, A. (2013) Animal models for hepatitis C. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.***369**: 49–86.
- Bissig, K.-D., Wieland, S.F., Tran, P., Isogawa, M., Le, T.T., Chisari, F.V., and Verma, I.M. (2010) Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J. Clin. Invest.***120**: 924–930.
- Bitzegeio, J., Bankwitz, D., Hueging, K., Haid, S., Brohm, C., Zeisel, M.B., et al. (2010) Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors. *PLoS Pathog.***6**: e1000978.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouillé, Y. (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.***80**: 6964–6972.
- Blight, K.J., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2002) Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.***76**: 13001–13014.
- Bocchetta, S., Maillard, P., Yamamoto, M., Gondeau, C., Douam, F., Lebreton, S., et al. (2014) Up-regulation of the ATP-binding cassette transporter A1 inhibits hepatitis C virus infection. *PLoS ONE***9**: e92140.
- Bode, J.G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Albrecht, U., Erhardt, A., Schaper, F., et al. (2003) IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J.***17**: 488–490.
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R.G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J.-P., et al. (2006) Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J. Biol. Chem.***281**: 22236–22247.

- Boulant, S., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2007) Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J. Gen. Virol.***88**: 2204–2213.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F., and Lavergne, J.-P. (2005) Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J. Virol.***79**: 11353–11365.
- Bowen, D.G. and Walker, C.M. (2005) Mutational escape from CD8+ T cell immunity HCV evolution, from chimpanzees to man. *J Exp Med***201**: 1709–1714.
- Boyer, A., Dumans, A., Beaumont, E., Etienne, L., Roingeard, P., and 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.
- Bradley, D., McCaustland, K., Krawczynski, K., Spelbring, J., Humphey, C., and Cook, E.H. (1991) Hepatitis C virus: Buoyant density if the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J. Med. Virol.***34**: 206–208.
- Brahm, A.J. and Hegele, R.A. (2015) Chylomicronaemia--current diagnosis and future therapies. *Nat Rev Endocrinol***11**: 352–362.
- Branch, A.D., Stump, D.D., Gutierrez, J.A., Eng, F., and 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.
- Branche, E., Conzelmann, S., Parisot, C., Bedert, L., Lévy, P.L., Bartosch, B., et al. (2016) Hepatitis C Virus Increases Occludin Expression via the Upregulation of Adipose Differentiation-Related Protein. *PLoS ONE***11**: e0146000.
- Brass, V., Berke, J.M., Montserret, R., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2008) Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***105**: 14545–14550.
- Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M., and Crotta, S. (2008) CD81 Is a Central Regulator of Cellular Events Required for Hepatitis C Virus Infection of Human Hepatocytes. *J. Virol.***82**: 8316–8329.
- Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S.L., Stura, E.A., Duquerroy, S., Lescar, J., et al. (2004) Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J***23**: 728–738.
- Bridge, S.H., Sheridan, D.A., Felmlee, D.J., Crossey, M.M.E., Fenwick, F.I., Lanyon, C.V., et al. (2015) PCSK9, apolipoprotein E and lipoviral particles in chronic hepatitis C genotype 3: evidence for genotype-specific regulation of lipoprotein metabolism. *J. Hepatol.***62**: 763–770.
- Brimacombe, C.L., Grove, J., Meredith, L.W., Hu, K., Syder, A.J., Flores, M.V., et al. (2011) Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J. Virol.***85**: 596–605.

Brown, E.A., Zhang, H., Ping, L.H., and Lemon, S.M. (1992) Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res.***20**: 5041–5045.

Brundert, M., Heeren, J., Merkel, M., Carambia, A., Herkel, J., Groitl, P., et al. (2011) Scavenger receptor CD36 mediates uptake of high density lipoproteins in mice and by cultured cells. *J. Lipid Res.***52**: 745–758.

Bultel-Brienne, S., Lestavel, S., Pilon, A., Laffont, I., Tailleux, A., Fruchart, J.-C., et al. (2002) Lipid Free Apolipoprotein E Binds to the Class B Type I Scavenger Receptor I (SR-BI) and Enhances Cholesteryl Ester Uptake from Lipoproteins. *J. Biol. Chem.***277**: 36092–36099.

Bung, C., Bochkaeva, Z., Terenin, I., Zinovkin, R., Shatsky, I.N., and Niepmann, M. (2010) Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Lett.***584**: 837–842.

C

Camus, G., Herker, E., Modi, A.A., Haas, J.T., Ramage, H.R., Farese, R.V., and Ott, M. (2013) Diacylglycerol acyltransferase-1 localizes hepatitis C virus NS5A protein to lipid droplets and enhances NS5A interaction with the viral capsid core. *J. Biol. Chem.***288**: 9915–9923.

Cao, X., Ding, Q., Lu, J., Tao, W., Huang, B., Zhao, Y., et al. (2015) MDA5 plays a critical role in interferon response during hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.***62**: 771–778.

Carrère-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002) Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J. Virol.***76**: 3720–3730.

Castera, L., Chouteau, P., Hezode, C., Zafrani, E.-S., Dhumeaux, D., and Pawlotsky, J.-M. (2005) Hepatitis C Virus-Induced Hepatocellular Steatosis. *Am J Gastroenterol***100**: 711–715.

Catanese, M.T., Ansuini, H., Graziani, R., Huby, T., Moreau, M., Ball, J.K., et al. (2010) Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. *J. Virol.***84**: 34–43.

Catanese, M.T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T.J., Andrus, L., Rice, W.J., et al. (2013) Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***110**: 9505–9510.

Chandler, D.E., Penin, F., Schulten, K., and Chipot, C. (2012) The p7 Protein of Hepatitis C Virus Forms Structurally Plastic, Minimalist Ion Channels. *PLoS Comput Biol***8**:

Chang, K.-S., Jiang, J., Cai, Z., and Luo, G. (2007) Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J. Virol.***81**: 13783–13793.

Chao, T.-C., Su, W.-C., Huang, J.-Y., Chen, Y.-C., Jeng, K.-S., Wang, H.-D., and Lai, M.M.C. (2012) Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 (PSTPIP2), a

host membrane-deforming protein, is critical for membranous web formation in hepatitis C virus replication. *J. Virol.***86**: 1739–1749.

Chen, J., Li, Q., and Wang, J. (2011) Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions. *Proc Natl Acad Sci U S A***108**: 14813–14818.

Chen, J., Zhao, Y., Zhang, C., Chen, H., Feng, J., Chi, X., et al. (2014) Persistent hepatitis C virus infections and hepatopathological manifestations in immune-competent humanized mice. *Cell Res***24**: 1050–1066.

Chen, S.L. and Morgan, T.R. (2006) The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Int J Med Sci***3**: 47–52.

Chen, X., Guo, Z., Okoro, E.U., Zhang, H., Zhou, L., Lin, X., et al. (2012) Up-regulation of ATP binding cassette transporter A1 expression by very low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E receptor 2. *J. Biol. Chem.***287**: 3751–3759.

Chevaliez, S. (2011) Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clinical Microbiology and Infection***17**: 116–121.

Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science***244**: 359–362.

Chung, R.T. and Baumert, T.F. (2014) Curing Chronic Hepatitis C — The Arc of a Medical Triumph. *New England Journal of Medicine***370**: 1576–1578.

Chung, R.T., Gordon, F.D., Curry, M.P., Schiano, T.D., Emre, S., Corey, K., et al. (2013) Human monoclonal antibody MBL-HCV1 delays HCV viral rebound following liver transplantation: a randomized controlled study. *Am. J. Transplant.***13**: 1047–1054.

Clément, S., Pascarella, S., and Negro, F. (2009) Hepatitis C virus infection: molecular pathways to steatosis, insulin resistance and oxidative stress. *Viruses***1**: 126–143.

Clément, S., Pascarella, S., Conzelmann, S., Gonelle-Gispert, C., Guilloux, K., and Negro, F. (2010) The hepatitis C virus core protein indirectly induces alpha-smooth muscle actin expression in hepatic stellate cells via interleukin-8. *J. Hepatol.***52**: 635–643.

Cocquerel, L., Beeck, A. Op de, Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., et al. (2002) Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J.***21**: 2893–2902.

Coelmont, L., Hanouille, X., Chatterji, U., Berger, C., Snoeck, J., Bobardt, M., et al. (2010) DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS ONE***5**: e13687.

Coller, K.E., Berger, K.L., Heaton, N.S., Cooper, J.D., Yoon, R., and 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., and Randall, G. (2012) Molecular Determinants and Dynamics of Hepatitis C Virus Secretion. *PLOS Pathog***8**: e1002466.

Conrad, K.D. and Niepmann, M. (2014) The role of microRNAs in hepatitis C virus RNA replication. *Arch. Virol.***159**: 849–862.

Conrad, K.D., Giering, F., Erfurth, C., Neumann, A., Fehr, C., Meister, G., and Niepmann, M. (2013) MicroRNA-122 dependent binding of Ago2 protein to hepatitis C virus RNA is associated with enhanced RNA stability and translation stimulation. *PLoS ONE***8**: e56272.

Cormier, E.G., Durso, R.J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W.C., et al. (2004) L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***101**: 14067–14072.

Counihan, N.A., Rawlinson, S.M., and Lindenbach, B.D. (2011) Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS Pathog.***7**: e1002302.

Cristofari, G., Ivanyi-Nagy, R., Gabus, C., Boulant, S., Lavergne, J.-P., Penin, F., and Darlix, J.-L. (2004) The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. *Nucleic Acids Res.***32**: 2623–2631.

Curry, M.P., Forns, X., Chung, R.T., Terrault, N.A., Brown, R., Fenkel, J.M., et al. (2015) Sofosbuvir and ribavirin prevent recurrence of HCV infection after liver transplantation: an open-label study. *Gastroenterology***148**: 100–107.e1.

D

Dansako, H., Yamane, D., Welsch, C., McGivern, D.R., Hu, F., Kato, N., and Lemon, S.M. (2013) Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells. *PLoS Pathog.***9**: e1003345.

Dao Thi, V.L., Granier, C., Zeisel, M.B., Guérin, M., Mancip, J., Granio, O., et al. (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.

Davidson, N.O. and Shelness, G.S. (2000) APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu. Rev. Nutr.***20**: 169–193.

de Chasse, B., Navratil, V., Tafforeau, L., Hiet, M.S., Aublin-Gex, A., Agaugué, S., et al. (2008) Hepatitis C virus infection protein network. *Mol. Syst. Biol.***4**: 230.

Decaens, C., Durand, M., Grosse, B., and Cassio, D. (2008) Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity? *Biol. Cell***100**: 387–398.

Di Lorenzo, C., Angus, A.G.N., and Patel, A.H. (2011) Hepatitis C Virus Evasion Mechanisms from Neutralizing Antibodies. *Viruses***3**: 2280–2300.

Diamond, D.L., Syder, A.J., Jacobs, J.M., Sorensen, C.M., Walters, K.-A., Prohl, S.C., et al. (2010) Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathog.***6**: e1000719.

Dong, L.M. and Weisgraber, K.H. (1996) Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.***271**: 19053–19057.

Dorner, M., Horwitz, J.A., Donovan, B.M., Labitt, R.N., Budell, W.C., Friling, T., et al. (2013) Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature***501**: 237–241.

Dorner, M., Horwitz, J.A., Robbins, J.B., Barry, W.T., Feng, Q., Mu, K., et al. (2011) A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature***474**: 208–211.

Douam, F., Dao Thi, V.L., Maurin, G., Fresquet, J., Mompelat, D., Zeisel, M.B., et al. (2014) Critical interaction between E1 and E2 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell entry. *Hepatology***59**: 776–788.

Dusheiko, G. (1997) Side effects of α interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology***26**: 112S–121S.

E

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

Einav, S., Elazar, M., Danieli, T., and Glenn, J.S. (2004) A Nucleotide Binding Motif in Hepatitis C Virus (HCV) NS4B Mediates HCV RNA Replication. *J. Virol.***78**: 11288–11295.

Eltahla, A.A., Luciani, F., White, P.A., Lloyd, A.R., and Bull, R.A. (2015) Inhibitors of the Hepatitis C Virus Polymerase; Mode of Action and Resistance. *Viruses***7**: 5206–5224.

Espósito, I., Trinks, J., and Soriano, V. (2016) Hepatitis C virus resistance to the new direct-acting antivirals. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*

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

F

Fabre, A.C., Malaval, C., Ben Addi, A., Verdier, C., Pons, V., Serhan, N., et al. (2010) P2Y₁₃ receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology***52**: 1477–1483.

Fafi-Kremer, S., Fauvelle, C., Felmlee, D.J., Zeisel, M.B., Lepiller, Q., Fofana, I., et al. (2012) Neutralizing Antibodies and Pathogenesis of Hepatitis C Virus Infection. *Viruses***4**: 2016–2030.

Fafi-Kremer, S., Fofana, I., Soulier, E., Carolla, P., Meuleman, P., Leroux-Roels, G., et al. (2010) Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation. *J. Exp. Med.***207**: 2019–2031.

- Falkowska, E., Kajumo, F., Garcia, E., Reinus, J., and Dragic, T. (2007) Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Glycans Modulate Entry, CD81 Binding, and Neutralization. *J. Virol.***81**: 8072–8079.
- Farci, P., Alter, H.J., Wong, D.C., Miller, R.H., Govindarajan, S., Engle, R., et al. (1994) Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A***91**: 7792–7796.
- Farquhar, M.J., Harris, H.J., Diskar, M., Jones, S., Mee, C.J., Nielsen, S.U., et al. (2008) Protein Kinase A-Dependent Step(s) in Hepatitis C Virus Entry and Infectivity. *J. Virol.***82**: 8797–8811.
- Farquhar, M.J., Hu, K., Harris, H.J., Davis, C., Brimacombe, C.L., Fletcher, S.J., et al. (2012) Hepatitis C Virus Induces CD81 and Claudin-1 Endocytosis. *J Virol***86**: 4305–4316.
- Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2006) Liver regeneration. *Hepatology***43**: S45–S53.
- Fauvelle, C., Felmlee, D.J., Crouchet, E., Lee, J., Heydmann, L., Lefèvre, M., et al. (2016) Apolipoprotein E Mediates Evasion From Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Gastroenterology***150**: 206–217.e4.
- Feingold, K.R. and Grunfeld, C. (2000) Introduction to Lipids and Lipoproteins. In, De Groot, L.J., Beck-Peccoz, P., Chrousos, G., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J.M., Koch, C., McLachlan, R., New, M., Rebar, R., Singer, F., Vinik, A., and Weickert, M.O. (eds), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- Felmlee, D.J., Coilly, A., Chung, R.T., Samuel, D., and Baumert, T.F. (2016) New perspectives for preventing hepatitis C virus liver graft infection. *Lancet Infect Dis***16**: 735–745.
- Felmlee, D.J., Hafirassou, M.L., Lefevre, M., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2013) Hepatitis C Virus, Cholesterol and Lipoproteins — Impact for the Viral Life Cycle and Pathogenesis of Liver Disease. *Viruses***5**: 1292–1324.
- Feng, Z., Hensley, L., McKnight, K.L., Hu, F., Madden, V., Ping, L., et al. (2013) A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature***496**: 367–371.
- Ferenci, P. (2015) Treatment of hepatitis C in difficult-to-treat patients. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology***12**: 284–292.
- Ferraris, P., Blanchard, E., and Roingeard, P. (2010) Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J. Gen. Virol.***91**: 2230–2237.
- Fitzgerald, M.L., Mujawar, Z., and Tamehiro, N. (2010) ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. *Atherosclerosis***211**: 361–370.
- Fletcher, N.F., Wilson, G.K., Murray, J., Hu, K., Lewis, A., Reynolds, G.M., et al. (2012) Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. *Gastroenterology***142**: 634–643.e6.
- Floreani, A. (2013) Hepatitis C and pregnancy. *World J. Gastroenterol.***19**: 6714–6720.

Fofana, I., Fafi-Kremer, S., Carolla, P., Fauvelle, C., Zahid, M.N., Turek, M., et al. (2012) Mutations that alter use of hepatitis C virus cell entry factors mediate escape from neutralizing antibodies. *Gastroenterology***143**: 223–233.e9.

Folgori, A., Capone, S., Ruggeri, L., Meola, A., Sporeno, E., Ercole, B.B., et al. (2006) A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat. Med.***12**: 190–197.

Forns, X., Thimme, R., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Chisari, F.V., and Bukh, J. (2000) Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***97**: 13318–13323.

Foster, T.L., Galloway, P., Stonehouse, N.J., and Harris, M. (2011) Cyclophilin A Interacts with Domain II of Hepatitis C Virus NS5A and Stimulates RNA Binding in an Isomerase-Dependent Manner ∇ . *J Virol***85**: 7460–7464.

Fournillier, A., Wychowski, C., Boucreux, D., Baumert, T.F., Meunier, J.-C., Jacobs, D., et al. (2001) Induction of Hepatitis C Virus E1 Envelope Protein-Specific Immune Response Can Be Enhanced by Mutation of N-Glycosylation Sites. *J Virol***75**: 12088–12097.

Fraser, C.S., Hershey, J.W.B., and Doudna, J.A. (2009) The pathway of hepatitis C virus mRNA recruitment to the human ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.***16**: 397–404.

Frentzen, A., Anggakusuma, null, Gürlevik, E., Hueging, K., Knocke, S., Ginkel, C., et al. (2014) Cell entry, efficient RNA replication, and production of infectious hepatitis C virus progeny in mouse liver-derived cells. *Hepatology***59**: 78–88.

Frentzen, A., Hüging, K., Bitzegeio, J., Friesland, M., Haid, S., Gentzsch, J., et al. (2011) Completion of hepatitis C virus replication cycle in heterokaryons excludes dominant restrictions in human non-liver and mouse liver cell lines. *PLoS Pathog.***7**: e1002029.

Friebe, P. and Bartenschlager, R. (2002) Genetic Analysis of Sequences in the 3' Nontranslated Region of Hepatitis C Virus That Are Important for RNA Replication. *J. Virol.***76**: 5326–5338.

Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J.-P., and Bartenschlager, R. (2005) Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J. Virol.***79**: 380–392.

Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., and Bartenschlager, R. (2001) Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J. Virol.***75**: 12047–12057.

Fukushi, S., Katayama, K., Kurihara, C., Ishiyama, N., Hoshino, F.B., Ando, T., and Oya, A. (1994) Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***199**: 425–432.

G

- Gale, M.J., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., et al. (1997) Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology***230**: 217–227.
- Gane, E.J. (2008) The natural history of recurrent hepatitis C and what influences this. *Liver Transpl***14**: S36–S44.
- Gane, E.J., Stedman, C.A., Hyland, R.H., Ding, X., Svarovskaia, E., Symonds, W.T., et al. (2013) Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. *N. Engl. J. Med.***368**: 34–44.
- Garai, K. and Frieden, C. (2010) The association-dissociation behavior of the ApoE proteins: kinetic and equilibrium studies. *Biochemistry***49**: 9533–9541.
- Garcia-Retortillo, M., Forns, X., Feliu, A., Moitinho, E., Costa, J., Navasa, M., et al. (2002) Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology***35**: 680–687.
- Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T., and Olson, W.C. (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***100**: 4498–4503.
- Garrone, P., Fluckiger, A.-C., Mangeot, P.E., Gauthier, E., Dupeyrot-Lacas, P., Mancip, J., et al. (2011) A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques. *Sci Transl Med***3**: 94ra71.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., and Chisari, F.V. (2008) Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.***82**: 2120–2129.
- Gaudreault, N., Kumar, N., Posada, J.M., Stephens, K.B., Reyes de Mochel, N.S., Eberlé, D., et al. (2012) ApoE suppresses atherosclerosis by reducing lipid accumulation in circulating monocytes and the expression of inflammatory molecules on monocytes and vascular endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***32**: 264–272.
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., et al. (2009) Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature***461**: 399–401.
- Gentsch, J., Brohm, C., Steinmann, E., Friesland, M., Menzel, N., Vieyres, G., et al. (2013) Hepatitis C Virus p7 is Critical for Capsid Assembly and Envelopment. *PLOS Pathog***9**: e1003355.
- Getz, G.S. and Reardon, C.A. (2009) Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J. Lipid Res.***50 Suppl**: S156–161.
- Goffinet, M., Tardy, C., Boubekour, N., Cholez, G., Bluteau, A., Oniciu, D.C., et al. (2014) P2Y13 receptor regulates HDL metabolism and atherosclerosis in vivo. *PLoS ONE***9**: e95807.

Gondeau, C., Briolotti, P., Razafy, F., Duret, C., Rubbo, P.-A., Helle, F., et al. (2014) In vitro infection of primary human hepatocytes by HCV-positive sera: insights on a highly relevant model. *Gut***63**: 1490–1500.

Goossens, N. and Hoshida, Y. (2015) Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol***21**: 105–114.

Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003) Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *J Virol***77**: 5487–5492.

Gouttenoire, J., Penin, F., and Moradpour, D. (2010a) Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Rev. Med. Virol.***20**: 117–129.

Gouttenoire, J., Roingard, P., Penin, F., and Moradpour, D. (2010b) Amphipathic alpha-helix AH2 is a major determinant for the oligomerization of hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *J. Virol.***84**: 12529–12537.

Grakoui, A., Shoukry, N.H., Woollard, D.J., Han, J.-H., Hanson, H.L., Ghayeb, J., et al. (2003) HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science***302**: 659–662.

Grompe, M., Lindstedt, S., al-Dhalimy, M., Kennaway, N.G., Papaconstantinou, J., Torres-Ramos, C.A., et al. (1995) Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat. Genet.***10**: 453–460.

Grove, J., Nielsen, S., Zhong, J., Bassendine, M.F., Drummer, H.E., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2008) Identification of a Residue in Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein That Determines Scavenger Receptor BI and CD81 Receptor Dependency and Sensitivity to Neutralizing Antibodies. *J. Virol.***82**: 12020–12029.

Gusarova, V., Brodsky, J.L., and Fisher, E.A. (2003) Apolipoprotein B100 Exit from the Endoplasmic Reticulum (ER) Is COPII-dependent, and Its Lipidation to Very Low Density Lipoprotein Occurs Post-ER. *J. Biol. Chem.***278**: 48051–48058.

Gylling, H. (2004) Cholesterol metabolism and its implications for therapeutic interventions in patients with hypercholesterolaemia. *International Journal of Clinical Practice***58**: 859–866.

H

Hajarizadeh, B., Grebely, J., and Dore, G.J. (2013) Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol***10**: 553–562.

Harrington, M. (2012) State of the (research) chimp. *Lab Anim (NY)***41**: 31.

Harris, H.J., Davis, C., Mullins, J.G.L., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M.J., et al. (2010) Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J. Biol. Chem.***285**: 21092–21102.

Harrus, D., Ahmed-El-Sayed, N., Simister, P.C., Miller, S., Triconnet, M., Hagedorn, C.H., et al. (2010) Further insights into the roles of GTP and the C terminus of the hepatitis C virus polymerase in the initiation of RNA synthesis. *J. Biol. Chem.***285**: 32906–32918.

- Hatters, D.M., Budamagunta, M.S., Voss, J.C., and Weisgraber, K.H. (2005) Modulation of apolipoprotein E structure by domain interaction: differences in lipid-bound and lipid-free forms. *J. Biol. Chem.***280**: 34288–34295.
- Hatters, D.M., Peters-Libeu, C.A., and Weisgraber, K.H. (2006) Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem. Sci.***31**: 445–454.
- Hauser, P.S. and Ryan, R.O. (2013) Impact of Apolipoprotein E on Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res***10**: 809–817.
- Hauser, P.S., Narayanaswami, V., and Ryan, R.O. (2011) Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog. Lipid Res.***50**: 62–74.
- Hayes, C.N., Imamura, M., Aikata, H., and Chayama, K. (2012) Genetics of IL28B and HCV--response to infection and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol***9**: 406–417.
- Heeren, J., Beisiegel, U., and Grewal, T. (2006) Apolipoprotein E Recycling Implications for Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol***26**: 442–448.
- Hegele, R.A. (2009) Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet***10**: 109–121.
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C.G., Fehr, C., et al. (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.***27**: 3300–3310.
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A.R., et al. (2010) Efficient Hepatitis C Virus Particle Formation Requires Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1). *Nat Med***16**: 1295–1298.
- Hernandez-Gea, V. and Friedman, S.L. (2011) Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease***6**: 425–456.
- Hiraga, N., Imamura, M., Tsuge, M., Noguchi, C., Takahashi, S., Iwao, E., et al. (2007) Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett.***581**: 1983–1987.
- Horner, S.M. and Gale, M. (2013) Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat. Med.***19**: 879–888.
- Horner, S.M., Liu, H.M., Park, H.S., Briley, J., and Gale, M. (2011) Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***108**: 14590–14595.
- Houghton, M. (2009) Discovery of the hepatitis C virus. *Liver International***29**: 82–88.
- Hourioux, C., Ait-Goughoulte, M., Patient, R., Fouquenot, D., Arcanger-Doudet, F., Brand, D., et al. (2007) Core protein domains involved in hepatitis C virus-like particle assembly and budding at the endoplasmic reticulum membrane. *Cell. Microbiol.***9**: 1014–1027.
- Hsieh, Y.-H. and Chou, C.-Y. (2011) Structural and functional characterization of human apolipoprotein E 72-166 peptides in both aqueous and lipid environments. *Journal of Biomedical Science***18**: 4.

Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003) Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *PNAS***100**: 7271–7276.

Hsu, S.-H., Wang, B., Kota, J., Yu, J., Costinean, S., Kutay, H., et al. (2012) Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J. Clin. Invest.***122**: 2871–2883.

Hsu, S.-H., Yeh, M.-L., Wang, S.-N., Hsu, S.-H., Yeh, M.-L., and Wang, S.-N. (2013) New Insights in Recurrent HCV Infection after Liver Transplantation, New Insights in Recurrent HCV Infection after Liver Transplantation. *Journal of Immunology Research, Journal of Immunology Research***2013**, **2013**: e890517.

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

Huang, J.-T., Tseng, C.-P., Liao, M.-H., Lu, S.-C., Yeh, W.-Z., Sakamoto, N., et al. (2013) Hepatitis C virus replication is modulated by the interaction of nonstructural protein NS5B and fatty acid synthase. *J. Virol.***87**: 4994–5004.

Huang, Y. and Mahley, R.W. (2014) Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol. Dis.***72 Pt A**: 3–12.

Huang, Y., Ji, Z.S., Brecht, W.J., Rall, S.C., Taylor, J.M., and Mahley, R.W. (1999) Overexpression of apolipoprotein E3 in transgenic rabbits causes combined hyperlipidemia by stimulating hepatic VLDL production and impairing VLDL lipolysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***19**: 2952–2959.

Hwang, J., Huang, L., Cordek, D.G., Vaughan, R., Reynolds, S.L., Kihara, G., et al. (2010) Hepatitis C virus nonstructural protein 5A: biochemical characterization of a novel structural class of RNA-binding proteins. *J. Virol.***84**: 12480–12491.

I

Ishibashi, H., Nakamura, M., Komori, A., Migita, K., and Shimoda, S. (2009) Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol***31**: 399–409.

Ishii, K., Murakami, K., Hmwe, S.S., Zhang, B., Li, J., Shirakura, M., et al. (2008) Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***371**: 446–450.

Isken, O., Langerwisch, U., Jirasko, V., Rehders, D., Redecke, L., Ramanathan, H., et al. (2015) A conserved NS3 surface patch orchestrates NS2 protease stimulation, NS5A hyperphosphorylation and HCV genome replication. *PLoS Pathog.***11**: e1004736.

J

Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***11**: 113–127.

Jacobson, I.M., Gordon, S.C., Kowdley, K.V., Yoshida, E.M., Rodriguez-Torres, M., Sulkowski, M.S., et al. (2013) Sofosbuvir for Hepatitis C Genotype 2 or 3 in Patients without Treatment Options. *New England Journal of Medicine***368**: 1867–1877.

Jacobson, I.M., McHutchison, J.G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A.M., Reddy, K.R., Bzowej, N.H., et al. (2011) Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.***364**: 2405–2416.

Jammart, B., Michelet, M., Pécheur, E.-I., Parent, R., Bartosch, B., Zoulim, F., and Durantel, D. (2013) Very-low-density lipoprotein (VLDL)-producing and hepatitis C virus-replicating HepG2 cells secrete no more lipoviroparticles than VLDL-deficient Huh7.5 cells. *J. Virol.***87**: 5065–5080.

Jang, S.K., Kräusslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., and Wimmer, E. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.***62**: 2636–2643.

Ji, A., Wroblewski, J.M., Cai, L., de Beer, M.C., Webb, N.R., and van der Westhuyzen, D.R. (2012) Nascent HDL formation in hepatocytes and role of ABCA1, ABCG1, and SR-BI. *J Lipid Res***53**: 446–455.

Jiang, J., Cun, W., Wu, X., Shi, Q., Tang, H., and Luo, G. (2012) Hepatitis C Virus Attachment Mediated by Apolipoprotein E Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. *J Virol***86**: 7256–7267.

Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J.Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2010) Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog.***6**: e1001233.

Jofre-Monseny, L., Minihane, A.-M., and Rimbach, G. (2008) Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk. *Mol Nutr Food Res***52**: 131–145.

Jones, C.T., Murray, C.L., Eastman, D.K., Tassello, J., and Rice, C.M. (2007) Hepatitis C Virus p7 and NS2 Proteins Are Essential for Production of Infectious Virus. *J. Virol.***81**: 8374–8383.

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

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

K

Kanda, T., Yokosuka, O., and Omata, M. (2013) Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma. *Biology***2**: 304–316.

- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., and Wakita, T. (2003) Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology***125**: 1808–1817.
- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., et al. (2001) Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J. Med. Virol.***64**: 334–339.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., et al. (2009) Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog.***5**: e1000546.
- Kawasaki, T., Kawai, T., and Akira, S. (2011) Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunol. Rev.***243**: 61–73.
- Keck, Z.-Y., Li, T.-K., Xia, J., Gal-Tanamy, M., Olson, O., Li, S.H., et al. (2008) Definition of a conserved immunodominant domain on hepatitis C virus E2 glycoprotein by neutralizing human monoclonal antibodies. *J. Virol.***82**: 6061–6066.
- Keck, Z., Girard-Blanc, C., Wang, W., Lau, P., Zuiani, A., Rey, F.A., et al. (2016) Antibody Response to Hypervariable Region 1 Interferes with Broadly Neutralizing Antibodies to Hepatitis C Virus. *J. Virol.***90**: 3112–3122.
- Kelly, M.E., Clay, M.A., Mistry, M.J., Hsieh-Li, H.M., and Harmony, J.A. (1994) Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell. Immunol.***159**: 124–139.
- Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldán, A., Tarr, P., Fishbein, M.C., et al. (2005) ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.***1**: 121–131.
- Khan, A.G., Miller, M.T., and Marcotrigiano, J. (2015) HCV glycoprotein structures: what to expect from the unexpected. *Current Opinion in Virology***12**: 53–58.
- Khan, A.G., Whidby, J., Miller, M.T., Scarborough, H., Zatorski, A.V., Cygan, A., et al. (2014) Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature***509**: 381–384.
- Khera, A.V., Cuchel, M., de la Llera-Moya, M., Rodrigues, A., Burke, M.F., Jafri, K., et al. (2011) Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.***364**: 127–135.
- Kim, K.H., Hong, S.P., Kim, K., Park, M.J., Kim, K.J., and Cheong, J. (2007) HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***355**: 883–888.
- Kim, S., Welsch, C., Yi, M., and Lemon, S.M. (2011) Regulation of the Production of Infectious Genotype 1a Hepatitis C Virus by NS5A Domain III ν . *J. Virol.***85**: 6645–6656.
- Klein, K.C., Polyak, S.J., and Lingappa, J.R. (2004) Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly. *J. Virol.***78**: 9257–9269.

Kohan, A.B., Wang, F., Lo, C.-M., Liu, M., and Tso, P. (2015) ApoA-IV: current and emerging roles in intestinal lipid metabolism, glucose homeostasis, and satiety. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology***308**: G472–G481.

Kolykhalov, A.A., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (1996) Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol.***70**: 3363–3371.

Kolykhalov, A.A., Mihalik, K., Feinstone, S.M., and Rice, C.M. (2000) Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J. Virol.***74**: 2046–2051.

Kong, L., Giang, E., Nieuwsma, T., Kadam, R.U., Cogburn, K.E., Hua, Y., et al. (2013) Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science***342**: 1090–1094.

Kontush, A., Lindahl, M., Lhomme, M., Calabresi, L., Chapman, M.J., and Davidson, W.S. (2015) Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol***224**: 3–51.

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

Kralj, D., Jukić, L.V., Stojšavljević, S., Duvnjak, M., Smolić, M., and Čurčić, I.B. (2016) Hepatitis C Virus, Insulin Resistance, and Steatosis. *J Clin Transl Hepatol***4**: 66–75.

Krey, T., d'Alayer, J., Kikuti, C.M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, I., et al. (2010) The Disulfide Bonds in Glycoprotein E2 of Hepatitis C Virus Reveal the Tertiary Organization of the Molecule. *PLOS Pathog***6**: e1000762.

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

Kurosaki, M., Enomoto, N., Marumo, F., and Sato, C. (1993) Rapid sequence variation of the hypervariable region of hepatitis C virus during the course of chronic infection. *Hepatology***18**: 1293–1299.

L

Labonté, P., Begley, S., Guévin, C., Asselin, M.-C., Nassoury, N., Mayer, G., et al. (2009) PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology***50**: 17–24.

Lambotin, M., Raghuraman, S., Stoll-Keller, F., Baumert, T.F., and Barth, H. (2010) A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nat Rev Micro***8**: 350–360.

Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., et al. (2010) Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science***327**: 198–201.

- Lavanchy, D. (2011) Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin. Microbiol. Infect.***17**: 107–115.
- Law, J.L.M., Chen, C., Wong, J., Hockman, D., Santer, D.M., Frey, S.E., et al. (2013) A Hepatitis C Virus (HCV) Vaccine Comprising Envelope Glycoproteins gpE1/gpE2 Derived from a Single Isolate Elicits Broad Cross-Genotype Neutralizing Antibodies in Humans. *PLOS ONE***8**: e59776.
- Law, M., Maruyama, T., Lewis, J., Giang, E., Tarr, A.W., Stamataki, Z., et al. (2008) Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat. Med.***14**: 25–27.
- Lawitz, E., Mangia, A., Wyles, D., Rodriguez-Torres, M., Hassanein, T., Gordon, S.C., et al. (2013) Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N. Engl. J. Med.***368**: 1878–1887.
- Le, Q.-T., Blanchet, M., Seidah, N.G., and Labonté, P. (2015) Plasma membrane CD81 complexes with PCSK9 and LDLR and its levels are reduced by PCSK9. *J. Biol. Chem.* jbc.M115.642991.
- Lechner, F., Wong, D.K., Dunbar, P.R., Chapman, R., Chung, R.T., Dohrenwend, P., et al. (2000) Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.***191**: 1499–1512.
- Lee, J.-Y., Acosta, E.G., Stoeck, I.K., Long, G., Hiet, M.-S., Mueller, B., et al. (2014) Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins. *J. Virol.***88**: 12422–12437.
- Lefèvre, M., Felmler, D.J., Parnot, M., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2014) Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E. *PLoS ONE***9**: e95550.
- Lemon, S.M. and McGivern, D.R. (2012) Is hepatitis C virus carcinogenic? *Gastroenterology***142**: 1274–1278.
- Lesburg, C.A., Radfar, R., and Weber, P.C. (2000) Recent advances in the analysis of HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Curr Opin Investig Drugs***1**: 289–296.
- Li, H., Dhanasekaran, P., Alexander, E.T., Rader, D.J., Phillips, M.C., and Lund-Katz, S. (2013) Molecular mechanisms responsible for the differential effects of apoE3 and apoE4 on plasma lipoprotein-cholesterol levels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***33**: 687–693.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C.M., Ikeda, M., et al. (2005) Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A***102**: 2992–2997.
- Li, K., Li, N.L., Wei, D., Pfeffer, S.R., Fan, M., and Pfeffer, L.M. (2012) Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected hepatocytes depends on Toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates. *Hepatology***55**: 666–675.

- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., et al. (2011) AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-induced Insulin Resistant Mice. *Cell Metab***13**: 376–388.
- Liang, T.J. and Ghany, M.G. (2013) Current and future therapies for hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.***368**: 1907–1917.
- Liang, Y., Shilagard, T., Xiao, S.-Y., Snyder, N., Lau, D., Cicalese, L., et al. (2009) Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy. *Gastroenterology***137**: 1448–1458.
- Lin, W., Choe, W.H., Hiasa, Y., Kamegaya, Y., Blackard, J.T., Schmidt, E.V., and Chung, R.T. (2005) Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology***128**: 1034–1041.
- Lindenbach, B.D. (2013) Virion Assembly and Release. *Curr Top Microbiol Immunol***369**: 199–218.
- Lindenbach, B.D. and Rice, C.M. (2013) The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat. Rev. Microbiol.***11**: 688–700.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wölk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., et al. (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science***309**: 623–626.
- Lindenbach, B.D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A.J., McKeating, J.A., et al. (2006) Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***103**: 3805–3809.
- Lindenbach, B.D., Prágai, B.M., Montserret, R., Beran, R.K.F., Pyle, A.M., Penin, F., and Rice, C.M. (2007) The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J. Virol.***81**: 8905–8918.
- Liu, Z., Yang, F., Robotham, J.M., and Tang, H. (2009) Critical role of cyclophilin A and its prolyl-peptidyl isomerase activity in the structure and function of the hepatitis C virus replication complex. *J. Virol.***83**: 6554–6565.
- Locker, N., Easton, L.E., and Lukavsky, P.J. (2007) HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *EMBO J.***26**: 795–805.
- Lohmann, V. (2013) Hepatitis C virus RNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.***369**: 167–198.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science***285**: 110–113.
- Loizides-Mangold, U., Clément, S., Alfonso-Garcia, A., Branche, E., Conzelmann, S., Parisot, C., et al. (2014) HCV 3a core protein increases lipid droplet cholesteryl ester content via a mechanism dependent on sphingolipid biosynthesis. *PLoS ONE***9**: e115309.
- Long, G., Hiet, M.-S., Windisch, M.P., Lee, J.-Y., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2011) Mouse hepatic cells support assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Gastroenterology***141**: 1057–1066.

Lorenz, I.C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T.G., and Rice, C.M. (2006) Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature***442**: 831–835.

Love, R.A., Brodsky, O., Hickey, M.J., Wells, P.A., and Cronin, C.N. (2009) Crystal structure of a novel dimeric form of NS5A domain I protein from hepatitis C virus. *J. Virol.***83**: 4395–4403.

Lu, B., Morrow, J.A., and Weisgraber, K.H. (2000) Conformational reorganization of the four-helix bundle of human apolipoprotein E in binding to phospholipid. *J. Biol. Chem.***275**: 20775–20781.

Luik, P., Chew, C., Aittoniemi, J., Chang, J., Wentworth, P., Dwek, R.A., et al. (2009) The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***106**: 12712–12716.

Lukavsky, P.J. (2009) Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res.***139**: 166–171.

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

M

Maasoumy, B. and Wedemeyer, H. (2012) Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology***26**: 401–412.

Mackey, R.H., Greenland, P., Goff, D.C., Lloyd-Jones, D., Sibley, C.T., and Mora, S. (2012) High-density lipoprotein cholesterol and particle concentrations, carotid atherosclerosis, and coronary events: MESA (multi-ethnic study of atherosclerosis). *J. Am. Coll. Cardiol.***60**: 508–516.

Madan, V., Paul, D., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2014) Inhibition of HCV replication by cyclophilin antagonists is linked to replication fitness and occurs by inhibition of membranous web formation. *Gastroenterology***146**: 1361–1372.e1–9.

Mahley, R.W. (2016) Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *J. Mol. Med.*

Mahley, R.W. and Rall, S.C. (2000) APOLIPOPROTEIN E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annual Review of Genomics and Human Genetics***1**: 507–537.

Mailly, L., Robinet, E., Meuleman, P., Baumert, T.F., and Zeisel, M.B. (2013) Hepatitis C virus infection and related liver disease: the quest for the best animal model. *Front Microbiol***4**: 213.

Maily, L., Xiao, F., Lupberger, J., Wilson, G.K., Aubert, P., Duong, F.H.T., et al. (2015) Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat. Biotechnol.***33**: 549–554.

Majzoub, K., Hafirassou, M.L., Meignin, C., Goto, A., Marzi, S., Fedorova, A., et al. (2014) RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell***159**: 1086–1095.

- Mankouri, J. and Harris, M. (2011) Viruses and the fuel sensor: the emerging link between AMPK and virus replication. *Rev. Med. Virol.***21**: 205–212.
- Mankouri, J., Tedbury, P.R., Gretton, S., Hughes, M.E., Griffin, S.D.C., Dallas, M.L., et al. (2010) Enhanced hepatitis C virus genome replication and lipid accumulation mediated by inhibition of AMP-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A***107**: 11549–11554.
- Maric, J., Kiss, R.S., Franklin, V., and Marcel, Y.L. (2005) Intracellular lipidation of newly synthesized apolipoprotein A-I in primary murine hepatocytes. *J. Biol. Chem.***280**: 39942–39949.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., et al. (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.
- McLauchlan, J., Lemberg, M.K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002) Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J***21**: 3980–3988.
- Meertens, L., Bertaux, C., and Dragic, T. (2006) Hepatitis C Virus Entry Requires a Critical Postinternalization Step and Delivery to Early Endosomes via Clathrin-Coated Vesicles. *J Virol***80**: 11571–11578.
- Menzel, N., Fischl, W., Hueging, K., Bankwitz, D., Frentzen, A., Haid, S., et al. (2012) MAP-Kinase Regulated Cytosolic Phospholipase A2 Activity Is Essential for Production of Infectious Hepatitis C Virus Particles. *PLOS Pathog***8**: e1002829.
- Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., et al. (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.***7**: 927–933.
- Merz, A., Long, G., Hiet, M.-S., Brügger, B., Chlanda, P., Andre, P., et al. (2011) Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J. Biol. Chem.***286**: 3018–3032.
- Messina, J.P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G.S., Pybus, O.G., and Barnes, E. (2015) Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology***61**: 77–87.
- Meuleman, P., Bukh, J., Verhoye, L., Farhoudi, A., Vanwolleghem, T., Wang, R.Y., et al. (2011) In vivo evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus. *Hepatology***53**: 755–762.
- Meuleman, P., Libbrecht, L., De Vos, R., de Hemptinne, B., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., et al. (2005) Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology***41**: 847–856.
- Meunier, J.-C., Russell, R.S., Engle, R.E., Faulk, K.N., Purcell, R.H., and Emerson, S.U. (2008) Apolipoprotein C1 Association with Hepatitis C Virus. *J. Virol.***82**: 9647–9656.

Meunier, J.-C., Russell, R.S., Goossens, V., Priem, S., Walter, H., Depla, E., et al. (2008) Isolation and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the e1 glycoprotein of hepatitis C virus. *J. Virol.***82**: 966–973.

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

Mitchell, J.K., Lemon, S.M., and McGivern, D.R. (2015) How do persistent infections with hepatitis C virus cause liver cancer? *Curr Opin Virol***14**: 101–108.

Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., et al. (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.***9**: 1089–1097.

Mondelli, M.U., Cerino, A., Segagni, L., Meola, A., Cividini, A., Silini, E., and Nicosia, A. (2001) Hypervariable region 1 of hepatitis C virus: immunological decoy or biologically relevant domain? *Antiviral Res.***52**: 153–159.

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

Moradpour, D. and Penin, F. (2013) Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.***369**: 113–142.

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

Morgan, A.E., Mooney, K.M., Wilkinson, S.J., Pickles, N.A., and Mc Auley, M.T. (2016) Cholesterol metabolism: A review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation. *Ageing Res. Rev.***27**: 108–124.

Morgello, S., Murray, J., Van Der Elst, S., and Byrd, D. (2014) HCV, but not HIV, is a risk factor for cerebral small vessel disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm***1**:

Morikawa, K., Lange, C.M., Gouttenoire, J., Meylan, E., Brass, V., Penin, F., and Moradpour, D. (2011) Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J. Viral Hepat.***18**: 305–315.

Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., et al. (1998) The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat. Med.***4**: 1065–1067.

Mosley, R.T., Edwards, T.E., Murakami, E., Lam, A.M., Grice, R.L., Du, J., et al. (2012) Structure of Hepatitis C Virus Polymerase in Complex with Primer-Template RNA. *J. Virol.***86**: 6503–6511.

Murphy, D.G., Sablon, E., Chamberland, J., Fournier, E., Dandavino, R., and Tremblay, C.L. (2015) Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa. *J. Clin. Microbiol.***53**: 967–972.

N

Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.***42**: 3858–3863.

Nakashima, K., Takeuchi, K., Chihara, K., Hotta, H., and Sada, K. (2011) Inhibition of hepatitis C virus replication through adenosine monophosphate-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Microbiol. Immunol.***55**: 774–782.

Naugler, W.E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A.M., and Karin, M. (2007) Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science***317**: 121–124.

Neddermann, P., Quintavalle, M., Di Pietro, C., Clementi, A., Cerretani, M., Altamura, S., et al. (2004) Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J. Virol.***78**: 13306–13314.

Nelson, P.K., Mathers, B.M., Cowie, B., Hagan, H., Des Jarlais, D., Horyniak, D., and Degenhardt, L. (2011) Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet***378**: 571–583.

Neumann-Haefelin, C. and Thimme, R. (2013) Adaptive immune responses in hepatitis C virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.***369**: 243–262.

Neveu, G., Barouch-Bentov, R., Ziv-Av, A., Gerber, D., Jacob, Y., and Einav, S. (2012) Identification and targeting of an interaction between a tyrosine motif within hepatitis C virus core protein and AP2M1 essential for viral assembly. *PLoS Pathog.***8**: e1002845.

Niepmann, M. (2009) Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms***1789**: 529–541.

Niepmann, M. (2013) Hepatitis C virus RNA translation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.***369**: 143–166.

Nimpf, J. and Schneider, W.J. (2000) From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids***1529**: 287–298.

O

Okamoto, K., Mori, Y., Komoda, Y., Okamoto, T., Okochi, M., Takeda, M., et al. (2008) Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.***82**: 8349–8361.

Okoro, E.U., Zhao, Y., Guo, Z., Zhou, L., Lin, X., and Yang, H. (2012) Apolipoprotein E4 Is Deficient in Inducing Macrophage ABCA1 Expression and Stimulating the Sp1 Signaling Pathway. *PLoS ONE***7**: e44430.

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

Olsen, D.B., Davies, M.-E., Handt, L., Koeplinger, K., Zhang, N.R., Ludmerer, S.W., et al. (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.

Omari, K. El, Iourin, O., Kadlec, J., Sutton, G., Harlos, K., Grimes, J.M., and Stuart, D.I. (2014) Unexpected structure for the N-terminal domain of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1. *Nat Commun***5**: 4874.

Oram, J.F. and Yokoyama, S. (1996) Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J. Lipid Res.***37**: 2473–2491.

OuYang, B., Xie, S., Berardi, M.J., Zhao, X., Dev, J., Yu, W., et al. (2013) Unusual architecture of the p7 channel from hepatitis C virus. *Nature***498**: 521–525.

P

Park, C.-Y., Jun, H.-J., Wakita, T., Cheong, J.H., and Hwang, S.B. (2009) Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J. Biol. Chem.***284**: 9237–9246.

Park, S.-H. and Rehermann, B. (2014) Immune Responses to HCV and Other Hepatitis Viruses. *Immunity***40**: 13–24.

Paul, D., Madan, V., and Bartenschlager, R. (2014) Hepatitis C Virus RNA Replication and Assembly: Living on the Fat of the Land. *Cell Host & Microbe***16**: 569–579.

Paul, D., Romero-Brey, I., Gouttenoire, J., Stoitsova, S., Krijnse-Locker, J., Moradpour, D., and Bartenschlager, R. (2011) NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. *J. Virol.***85**: 6963–6976.

Pawlotsky, J.-M. (2013) Treatment of chronic hepatitis C: current and future. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.***369**: 321–342.

Pawlotsky, J.-M. (2014) New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology***146**: 1176–1192.

Pelletier, J. and Sonenberg, N. (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature***334**: 320–325.

Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., et al. (2004) Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J. Biol. Chem.***279**: 40835–40843.

Pérard, J., Leyrat, C., Baudin, F., Drouet, E., and Jamin, M. (2013) Structure of the full-length HCV IRES in solution. *Nat Commun***4**: 1612.

Perlemuter, G., Sabile, A., Letteron, P., Vona, G., Topilco, A., Chrétien, Y., et al. (2002) Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein

activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J.***16**: 185–194.

Pestka, J.M., Zeisel, M.B., Bläser, E., Schürmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.-L., et al. (2007) Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***104**: 6025–6030.

Phan, T., Beran, R.K.F., Peters, C., Lorenz, I.C., and Lindenbach, B.D. (2009) Hepatitis C virus NS2 protein contributes to virus particle assembly via opposing epistatic interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J. Virol.***83**: 8379–8395.

Phan, T., Kohlway, A., Dimberu, P., Pyle, A.M., and Lindenbach, B.D. (2011) The acidic domain of hepatitis C virus NS4A contributes to RNA replication and virus particle assembly. *J. Virol.***85**: 1193–1204.

Phillips, M.C. (2014) Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life***66**: 616–623.

Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., et al. (2006) Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***103**: 7408–7413.

Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., et al. (2002) Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J. Virol.***76**: 4008–4021.

Pietschmann, T., Zayas, M., Meuleman, P., Long, G., Appel, N., Koutsoudakis, G., et al. (2009) Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations. *PLoS Pathog.***5**: e1000475.

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

Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P., and Rice, C.M. (2009) Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature***457**: 882–886.

Podevin, P., Carpentier, A., Pène, V., Aoudjehane, L., Carrière, M., Zaïdi, S., et al. (2010) Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology***139**: 1355–1364.

Poordad, F., McCone, J.J., Bacon, B.R., Bruno, S., Manns, M.P., Sulkowski, M.S., et al. (2011) Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *New England Journal of Medicine***364**: 1195–1206.

Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingard, P., Moradpour, D., Descamps, V., et al. (2011) NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog.***7**: e1001278.

Popescu, C.-I., Riva, L., Vlaicu, O., Farhat, R., Rouillé, Y., and Dubuisson, J. (2014) Hepatitis C Virus Life Cycle and Lipid Metabolism. *Biology***3**: 892–921.

Prentoe, J., Jensen, T.B., Meuleman, P., Serre, S.B.N., Scheel, T.K.H., Leroux-Roels, G., et al. (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.

Pumeechockchai, W., Bevitt, D., Agarwal, K., Petropoulou, T., Langer, B.C.A., Belohradsky, B., et al. (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.

Q

Quade, N., Boehringer, D., Leibundgut, M., van den Heuvel, J., and Ban, N. (2015) Cryo-EM structure of Hepatitis C virus IRES bound to the human ribosome at 3.9-Å resolution. *Nat Commun***6**.

Quan, H., Zhou, F., Nie, D., Chen, Q., Cai, X., Shan, X., et al. (2014) Hepatitis C virus core protein epigenetically silences SFRP1 and enhances HCC aggressiveness by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene***33**: 2826–2835.

Quintavalle, M., Sambucini, S., Summa, V., Orsatti, L., Talamo, F., De Francesco, R., and 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

Rader, D.J. and Daugherty, A. (2008) Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature***451**: 904–913.

Ramasamy, I. (2014) Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin. Chem. Lab. Med.***52**: 1695–1727.

Rehermann, B. (2009) Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J. Clin. Invest.***119**: 1745–1754.

Reichhart, J. and Imler, J. (2000) Toll story. *médecine/sciences***16**: 1439.

Reiss, S., Harak, C., Romero-Brey, I., Radujkovic, D., Klein, R., Ruggieri, A., et al. (2013) The lipid kinase phosphatidylinositol-4 kinase III alpha regulates the phosphorylation status of hepatitis C virus NS5A. *PLoS Pathog.***9**: e1003359.

Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., et al. (2011) Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe***9**: 32–45.

Röhrl, C. and Stangl, H. (2013) HDL endocytosis and resecretion. *Biochim Biophys Acta***1831**: 1626–1633.

Roingard, P. and Depla, M. (2011) The birth and life of lipid droplets: learning from the hepatitis C virus. *Biology of the Cell***103**: 223–231.

Roingard, P., Hourieux, C., Blanchard, E., and Prensier, G. (2008) Hepatitis C virus budding at lipid droplet-associated ER membrane visualized by 3D electron microscopy. *Histochem. Cell Biol.***130**: 561–566.

Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., et al. (2012) Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog.***8**: e1003056.

Romero-López, C., Barroso-Deljesus, A., García-Sacristán, A., Briones, C., and Berzal-Herranz, A. (2014) End-to-end crosstalk within the hepatitis C virus genome mediates the conformational switch of the 3'X-tail region. *Nucleic Acids Res.***42**: 567–582.

Ryan, E.J. and O'Farrelly, C. (2011) The affect of chronic hepatitis C infection on dendritic cell function: a summary of the experimental evidence. *Journal of Viral Hepatitis***18**: 601–607.

S

Sabo, M.C., Luca, V.C., Prentoe, J., Hopcraft, S.E., Blight, K.J., Yi, M., et al. (2011) Neutralizing Monoclonal Antibodies against Hepatitis C Virus E2 Protein Bind Discontinuous Epitopes and Inhibit Infection at a Postattachment Step ν . *J Virol***85**: 7005–7019.

Sagnelli, E., Santantonio, T., Coppola, N., Fasano, M., Pisaturo, M., and Sagnelli, C. (2014) Acute hepatitis C: clinical and laboratory diagnosis, course of the disease, treatment. *Infection***42**: 601–610.

Sainz, B. and Chisari, F.V. (2006) Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J. Virol.***80**: 10253–10257.

Sainz, B., Barretto, N., Martin, D.N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., et al. (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, H., Dhanasekaran, P., Baldwin, F., Weisgraber, K.H., Lund-Katz, S., and Phillips, M.C. (2001) Lipid binding-induced conformational change in human apolipoprotein E. Evidence for two lipid-bound states on spherical particles. *J. Biol. Chem.***276**: 40949–40954.

Saito, H., Lund-Katz, S., and Phillips, M.C. (2004) Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Prog. Lipid Res.***43**: 350–380.

Santolini, E., Migliaccio, G., and La Monica, N. (1994) Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J. Virol.***68**: 3631–3641.

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

Schamberg, N.J. and Lake-Bakaar, G.V. (2007) Hepatitis C Virus-related Mixed Cryoglobulinemia. *Gastroenterol Hepatol (N Y)***3**: 695–703.

Schmidt-Mende, J., Bieck, E., Hugle, T., Penin, F., Rice, C.M., Blum, H.E., and Moradpour, D. (2001) Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.***276**: 44052–44063.

Schoggins, J.W. and Rice, C.M. (2013) Innate immune responses to hepatitis C virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.***369**: 219–242.

Schregel, V., Jacobi, S., Penin, F., and Tautz, N. (2009) Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *PNAS***106**: 5342–5347.

Schvoerer, E., Soulier, E., Royer, C., Renaudin, A.-C., Thumann, C., Fafi-Kremer, S., et al. (2007) Early evolution of hepatitis C virus (HCV) quasispecies after liver transplant for HCV-related disease. *J. Infect. Dis.***196**: 528–536.

Schwartz, G.G., Olsson, A.G., Abt, M., Ballantyne, C.M., Barter, P.J., Brumm, J., et al. (2012) Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.***367**: 2089–2099.

Sène, D., Limal, N., and Cacoub, P. (2004) Hepatitis C virus-associated extrahepatic manifestations: a review. *Metab Brain Dis***19**: 357–381.

Sharma, N.R., Mateu, G., Dreux, M., Grakoui, A., Cosset, F.-L., and Melikyan, G.B. (2011) Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *J. Biol. Chem.***286**: 30361–30376.

Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., McLauchlan, J., and Bartenschlager, R. (2007) The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J. Biol. Chem.***282**: 37158–37169.

Shi, S.T., Lee, K.-J., Aizaki, H., Hwang, S.B., and Lai, M.M.C. (2003) Hepatitis C Virus RNA Replication Occurs on a Detergent-Resistant Membrane That Cofractionates with Caveolin-2. *J. Virol.***77**: 4160–4168.

Shimakami, T., Yamane, D., Jangra, R.K., Kempf, B.J., Spaniel, C., Barton, D.J., and Lemon, S.M. (2012) Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***109**: 941–946.

Shore, V.G. and Shore, B. (1973) Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry***12**: 502–507.

Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghrayeb, J., Reimann, K.A., and Walker, C.M. (2003) Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J. Exp. Med.***197**: 1645–1655.

Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., and Duncan, S.A. (2010) Organogenesis and development of the liver. *Dev. Cell***18**: 175–189.

Siddiqi, S.A. (2008) VLDL exits from the endoplasmic reticulum in a specialized vesicle, the VLDL transport vesicle, in rat primary hepatocytes. *Biochem. J.***413**: 333–342.

Simister, P., Schmitt, M., Geitmann, M., Wicht, O., Danielson, U.H., Klein, R., et al. (2009) Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase. *J. Virol.***83**: 11926–11939.

- Simmonds, P. (2013) The origin of hepatitis C virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.***369**: 1–15.
- Sklan, E.H. and Glenn, J.S. (2006) HCV NS4B: From Obscurity to Central Stage. In: Tan, S.-L. (ed), *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Horizon Bioscience, Norfolk (UK).
- Smith, D.B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A.S., Rice, C.M., Stapleton, J.T., and 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.
- Sofia, M.J., Bao, D., Chang, W., Du, J., Nagarathnam, D., Rachakonda, S., et al. (2010) Discovery of a β -d-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *J. Med. Chem.***53**: 7202–7218.
- Sonenberg, N. and Hinnebusch, A.G. (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell***136**: 731–745.
- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Jünemann, C., Bartenschlager, R., and Niepmann, M. (2006) The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J. Virol.***80**: 11579–11588.
- Spaan, M., Janssen, H.L.A., and Boonstra, A. (2012) Immunology of hepatitis C virus infections. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology***26**: 391–400.
- Stapleford, K.A. and 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.
- Steinmann, E. and Pietschmann, T. (2010) Hepatitis C Virus P7—A Viroporin Crucial for Virus Assembly and an Emerging Target for Antiviral Therapy. *Viruses***2**: 2078–2095.
- Steinmann, E. and Pietschmann, T. (2013) Cell culture systems for hepatitis C virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.***369**: 17–48.
- Steinmann, E., Brohm, C., Kallis, S., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2008) Efficient trans-Encapsidation of Hepatitis C Virus RNAs into Infectious Virus-Like Particles. *J. Virol.***82**: 7034–7046.
- Strick-Marchand, H., Dusséaux, M., Darche, S., Huntington, N.D., Legrand, N., Masse-Ranson, G., et al. (2015) A novel mouse model for stable engraftment of a human immune system and human hepatocytes. *PLoS ONE***10**: e0119820.
- Sulkowski, M.S., Kang, M., Matining, R., Wyles, D., Johnson, V.A., Morse, G.D., et al. (2014) Safety and antiviral activity of the HCV entry inhibitor ITX5061 in treatment-naïve HCV-infected adults: a randomized, double-blind, phase 1b study. *J. Infect. Dis.***209**: 658–667.
- Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., et al. (2005) Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J. Virol.***79**: 2689–2699.

Sundaram, M. and Yao, Z. (2012) Intrahepatic role of exchangeable apolipoproteins in lipoprotein assembly and secretion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***32**: 1073–1078.

Syed, G.H., Amako, Y., and Siddiqui, A. (2010) Hepatitis C Virus Hijacks Host Lipid Metabolism. *Trends Endocrinol Metab***21**: 33.

T

Tarling, E.J. and Edwards, P.A. (2011) ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***108**: 19719–19724.

Tateno, C., Yoshizane, Y., Saito, N., Kataoka, M., Utoh, R., Yamasaki, C., et al. (2004) Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am. J. Pathol.***165**: 901–912.

Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., and Lai, M.M. (1999) Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science***285**: 107–110.

Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., and Treadaway, J. (2008) Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog.***4**: e1000032.

Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., and Rice, C.M. (2005) Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature***435**: 374–379.

Thomas, D.L. (2013) Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. *Nat. Med.***19**: 850–858.

Thomas, D.L., Thio, C.L., Martin, M.P., Qi, Y., Ge, D., O’Hugin, C., et al. (2009) Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature***461**: 798–801.

Thompson, A.A., Zou, A., Yan, J., Duggal, R., Hao, W., Molina, D., et al. (2009) Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity. *Biochemistry***48**: 906–916.

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

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

Tokuda, T., Calero, M., Matsubara, E., Vidal, R., Kumar, A., Permanne, B., et al. (2000) Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer’s amyloid beta peptides. *Biochem J***348**: 359–365.

Tomiyasu, K., Walsh, B.W., Ikewaki, K., Judge, H., and Sacks, F.M. (2001) Differential metabolism of human VLDL according to content of ApoE and ApoC-III. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***21**: 1494–1500.

Towler, M.C. and Hardie, D.G. (2007) AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. *Circ Res***100**: 328–341.

Trambas, C.M. and Griffiths, G.M. (2003) Delivering the kiss of death. *Nat Immunol***4**: 399–403.

Tsai, W.-C., Hsu, S.-D., Hsu, C.-S., Lai, T.-C., Chen, S.-J., Shen, R., et al. (2012) MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J. Clin. Invest.***122**: 2884–2897.

Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.***66**: 1476–1483.

Tzotzas, T., Desrumaux, C., and Lagrost, L. (2009) Plasma phospholipid transfer protein (PLTP): review of an emerging cardiometabolic risk factor. *Obes Rev***10**: 403–411.

U

U.S. Public Health Service (2001) Updated U.S. Public Health Service Guidelines for the Management of Occupational Exposures to HBV, HCV, and HIV and Recommendations for Postexposure Prophylaxis. *MMWR Recomm Rep***50**: 1–52.

Ujino, S., Nishitsuji, H., Hishiki, T., Sugiyama, K., Takaku, H., and Shimotohno, K. (2016) Hepatitis C virus utilizes VLDLR as a novel entry pathway. *PNAS***113**: 188–193.

Uprichard, S.L., Chung, J., Chisari, F.V., and Wakita, T. (2006) Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. *Virol. J.***3**: 89.

V

Vanwolleghem, T., Libbrecht, L., Hansen, B.E., Desombere, I., Roskams, T., Meuleman, P., and Leroux-Roels, G. (2010) Factors determining successful engraftment of hepatocytes and susceptibility to hepatitis B and C virus infection in uPA-SCID mice. *J. Hepatol.***53**: 468–476.

Vercauteren, K., de Jong, Y.P., and Meuleman, P. (2015) Animal models for the study of HCV. *Curr Opin Virol***13**: 67–74.

Verdegem, D., Badillo, A., Wieruszkeski, J.-M., Landrieu, I., Leroy, A., Bartenschlager, R., et al. (2011) Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A. *J. Biol. Chem.***286**: 20441–20454.

Vieyres, G., Dubuisson, J., and Patel, A.H. (2011) Characterization of antibody-mediated neutralization directed against the hypervariable region 1 of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J. Gen. Virol.***92**: 494–506.

Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A.H., and Dubuisson, J. (2010) Characterization of the Envelope Glycoproteins Associated with Infectious Hepatitis C Virus. *J. Virol.***84**: 10159–10168.

Vinaixa, C., Rubín, A., Aguilera, V., and Berenguer, M. (2013) Recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Ann Gastroenterol***26**: 304–313.

Vogt, A., Scull, M.A., Friling, T., Horwitz, J.A., Donovan, B.M., Dorner, M., et al. (2013) Recapitulation of the hepatitis C virus life-cycle in engineered murine cell lines. *Virology***444**: 1–11.

Voight, B.F., Peloso, G.M., Orho-Melander, M., Frikke-Schmidt, R., Barbalic, M., Jensen, M.K., et al. (2012) Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet***380**: 572–580.

Voisset, C. and Dubuisson, J. (2004) Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol. Cell***96**: 413–420.

von Hahn, T., Yoon, J.C., Alter, H., Rice, C.M., Rehermann, B., Balfe, P., and McKeating, J.A. (2007) Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology***132**: 667–678.

W

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

Wang, C., Sarnow, P., and Siddiqui, A. (1993) Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol***67**: 3338–3344.

Wang, H., Perry, J.W., Lauring, A.S., Neddermann, P., De Francesco, R., and Tai, A.W. (2014) Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology***146**: 1373–1385.e1–11.

Wang, N., Ranalletta, M., Matsuura, F., Peng, F., and Tall, A.R. (2006) LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***26**: 1310–1316.

Waris, G., Felmlee, D.J., Negro, F., and Siddiqui, A. (2007) Hepatitis C virus induces proteolytic cleavage of sterol regulatory element binding proteins and stimulates their phosphorylation via oxidative stress. *J. Virol.***81**: 8122–8130.

Washburn, M.L., Bility, M.T., Zhang, L., Kovalev, G.I., Buntzman, A., Frelinger, J.A., et al. (2011) A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology***140**: 1334–1344.

Webster, D.P., Klenerman, P., and Dusheiko, G.M. (2015) Hepatitis C. *Lancet***385**: 1124–1135.

Welbourn, S., Green, R., Gamache, I., Dandache, S., Lohmann, V., Bartenschlager, R., et al. (2005) Hepatitis C virus NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication. *J. Biol. Chem.***280**: 29604–29611.

Welsch, S., Müller, B., and Kräusslich, H.-G. (2007) More than one door – Budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Letters***581**: 2089–2097.

Westbrook, R.H. and Dusheiko, G. (2014) Natural history of hepatitis C. *J. Hepatol.***61**: S58–68.

Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Rall, S.C., and Weisgraber, K.H. (1988) Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. *J. Biol. Chem.***263**: 6240–6248.

Wherry, E.J. (2011) T cell exhaustion. *Nat Immunol***12**: 492–499.

Wiese, M., Fischer, J., Löbermann, M., Göbel, U., Grüngreiff, K., Güthoff, W., et al. (2014) Evaluation of liver disease progression in the German hepatitis C virus (1b)-contaminated anti-D cohort at 35 years after infection. *Hepatology***59**: 49–57.

Wilkins, T., Malcolm, J.K., Raina, D., and Schade, R.R. (2010) Hepatitis C: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician***81**: 1351–1357.

Wilson, C., Wardell, M.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., and Agard, D.A. (1991) Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science***252**: 1817–1822.

Wilson, E.M., Bial, J., Tarlow, B., Bial, G., Jensen, B., Greiner, D.L., et al. (2014) Extensive double humanization of both liver and hematopoiesis in FRGN mice. *Stem Cell Res***13**: 404–412.

Wirth, T.C. and Manns, M.P. (2016) The impact of the revolution in hepatitis C treatment on hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* mdw219.

Witteveldt, J., Evans, M.J., Bitzegeio, J., Koutsoudakis, G., Owsianka, A.M., Angus, A.G.N., et al. (2009) CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J. Gen. Virol.***90**: 48–58.

Wozniak, A.L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S.M., and Weinman, S.A. (2010) Intracellular Proton Conductance of the Hepatitis C Virus p7 Protein and Its Contribution to Infectious Virus Production. *PLOS Pathog***6**: e1001087.

X

Xiao, C., Hsieh, J., Adeli, K., and Lewis, G.F. (2011) Gut-liver interaction in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.***301**: E429–446.

Xiao, F., Fofana, I., Heydmann, L., Barth, H., Soulier, E., Habersetzer, F., et al. (2014) Hepatitis C virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents. *PLoS Pathog***10**: e1004128.

Y

Yamaga, A.K. and Ou, J. (2002) Membrane Topology of the Hepatitis C Virus NS2 Protein. *J. Biol. Chem.***277**: 33228–33234.

Yang, F., Robotham, J.M., Nelson, H.B., Irsigler, A., Kenworthy, R., and Tang, H. (2008) Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J. Virol.***82**: 5269–5278.

Yao, N., Reichert, P., Taremi, S.S., Prosis, W.W., and 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.

Yap, F., Craddock, L., and Yang, J. (2011) Mechanism of AMPK suppression of LXR-dependent Srebp-1c transcription. *Int. J. Biol. Sci.***7**: 645–650.

Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S.I., Ichikawa, M., Kajita, T., et al. (1998) The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.***72**: 6048–6055.

Ye, J., Li, J.Z., Liu, Y., Li, X., Yang, T., Ma, X., et al. (2009) Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B. *Cell Metab.***9**: 177–190.

Ye, J., Wang, C., Sumpter, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Gale, M. (2003) Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***100**: 15865–15870.

Yeh, S.-H. and Chen, P.-J. (2010) Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. *Oncology***78 Suppl 1**: 172–179.

Yi, M. and Lemon, S.M. (2003) 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.***77**: 3557–3568.

Yu, J.-W., Sun, L.-J., Liu, W., Zhao, Y.-H., Kang, P., and Yan, B.-Z. (2013) Hepatitis C virus core protein induces hepatic metabolism disorders through down-regulation of the SIRT1-AMPK signaling pathway. *Int. J. Infect. Dis.***17**: e539–545.

Z

Zahid, M.N., Turek, M., Xiao, F., Thi, V.L.D., Guérin, M., Fofana, I., et al. (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.

Zannis, V.I., Fotakis, P., Koukos, G., Kardassis, D., Ehnholm, C., Jauhiainen, M., and Chroni, A. (2015) HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. *Handb Exp Pharmacol***224**: 53–111.

Zeisel, M.-B., Fafi-Kremer, S., Fofana, I., Barth, H., Stoll-Keller, F., Doffoel, M., and Baumert, T.-F. (2007) Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.***13**: 4824–4830.

Zeisel, M.B., Crouchet, E., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2015) Host-Targeting Agents to Prevent and Cure Hepatitis C Virus Infection. *Viruses***7**: 5659–5685.

Zeisel, M.B., Felmler, D.J., and Baumert, T.F. (2013) Hepatitis C virus entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.***369**: 87–112.

Zhang, H., Wu, L.-M., Wu, J., Zhang, H., Wu, L.-M., and Wu, J. (2011) Cross-Talk between Apolipoprotein E and Cytokines, Cross-Talk between Apolipoprotein E and Cytokines. *Mediators of Inflammation, Mediators of Inflammation***2011, 2011**: e949072.

Zhao, X., Tang, Z.-Y., Klumpp, B., Wolff-Vorbeck, G., Barth, H., Levy, S., et al. (2002) Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J. Clin. Invest.***109**: 221–232.

Zhao, Y., Chen, X., Yang, H., Zhou, L., Okoro, E.U., and Guo, Z. (2011) A Novel Function of Apolipoprotein E: Upregulation of ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression. *PLoS ONE***6**: e21453.

Zheng, H., Kiss, R.S., Franklin, V., Wang, M.-D., Haidar, B., and Marcel, Y.L. (2005) ApoA-I lipidation in primary mouse hepatocytes. Separate controls for phospholipid and cholesterol transfers. *J. Biol. Chem.***280**: 21612–21621.

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

Zhong, J., Gastaminza, P., Chung, J., Stamataki, Z., Isogawa, M., Cheng, G., et al. (2006) Persistent Hepatitis C Virus Infection In Vitro: Coevolution of Virus and Host. *J. Virol.***80**: 11082–11093.

Zhu, Q., Guo, J.-T., and Seeger, C. (2003) Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J. Virol.***77**: 9204–9210.

Zona, L., Lupberger, J., Sidahmed-Adrar, N., Thumann, C., Harris, H.J., Barnes, A., et al. (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.

ANNEXES

N°1 : Composite vector formulation for multiple siRNA delivery as host targeting antiviral in a model of HCV chronic infection



ARTICLE

Composite vector formulation for multiple siRNA delivery as host targeting antiviral in a model of hepatitis C virus (HCV) chronic infection.

E. Crouchet,^{a,b*} R. Saad^{a,b,c*}, C. Zbaraszczuk^{b,c}, J. Ogier^{b,c}, T.F. Baumert^{a,b,d}, C. Schuster^{a,b} and F. Meyer^{b,c,e}

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

RNA interference (RNAi)-based gene therapies emerged recently as promising tools to treat viral chronic infection. In this study, we tested a nanovector-based approach for siRNA delivery in human hepatic cells. We designed an original composite nanoparticle by coating calcium phosphate core with two different siRNAs and pyridine- polyethyleneimine (π PEI). As a proof-of-concept, we tested these nanoparticles on a hepatitis C virus (HCV) chronic infection model. Using combinations of different siRNAs, we observed an efficient and prolonged reduction of HCV replication in hepatic cells. Moreover, we show that the layer-by-layer technique of coating applied triggers a sequential release of the siRNAs that acts on different steps of the HCV life cycle. Together, our results demonstrate the efficacy of these nanoparticles for siRNA delivery and open new perspectives for antiviral therapy.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic hepatitis worldwide. While recently clinically licensed direct-acting antivirals are expected to cure the large majority of infected patients, some challenges remain for difficult-to-treat patient subgroups. RNA interference (RNAi)-based gene therapies, using siRNA or shRNA, had recently emerged as a promising tool to treat chronic viral infection¹⁻³. However, considering the high mutation rates and the number of genotypes and sub-genotypes of RNA viruses such as hepatitis C virus (HCV), targeting viral sequences remains challenging. The recent development of host targeting antivirals (HTA), targeting host factors required for viral propagation constitutes an interesting alternative to overcome viral mutation, viral resistance to treatment and chronicity⁴. Delivery of HTAs using nanoparticle technology constitutes thus an innovative and challenging development that deserves

to be addressed.

From a biomaterial point of view, the advantage of (RNAi)-based gene therapy is that it allows modification of the siRNA sequence and consequently a huge diversity of the targets, without modifying the overall chemistry of the molecule. This results in a very versatile molecule targeting different intracellular pathways for which delivery strategy remains unchanged^{5,6}. Previous studies on the use of siRNA have put emphasis on several advantages when working with such molecules. Firstly, using cocktails of different siRNA targeting the same gene allows to increase the siRNA concentration without reaching the threshold of off target effects^{7,8}. Secondly, in antiviral therapy, it helps to treat multiple viral strains and sub-types. Chandra *et al.* show, in a model of HCV, that repeated treatments with two siRNA were better than single siRNA treatment at minimizing the development of escape mutants, resulting in a rapid inhibition of viral replication^{9,10}. Targeting various molecules is of paramount importance in helping control the different phases of viral infection, from viral entry to cell re-infection¹¹. Finally, previous studies have demonstrated that, in contrast to siRNA technology, the overexpression of exogenously introduced shRNA competes with endogenous miRNA and thus leads to saturation of the endogenous miRNA pathway, resulting in serious toxicity in mouse liver and, in some instances, death¹². Taking into account all these informations help to determine specifications for future nanovectors that could be used for

^a. Inserm, U1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, 67000 Strasbourg, France

^b. Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France.

^c. Inserm, U1121, Biomatériaux et Bioingénierie, FMFS, 67000 Strasbourg, France

^d. Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépatito-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

^e. Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle de médecine et chirurgie bucco-dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of any supplementary information available should be included here]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

various applications requiring delivery of multiple siRNA in a controlled manner.

Several attempts have been made using different approaches of vector formulation. Studies have been done on siRNA modification as well as on nanovector formulation. Tripodal RNA has been used in complexation with PolyEthylene Imine-Galactose (PEI-Gal), to target asialoglycoprotein receptor on hepatocytes, with three different siRNA targeting apolipoprotein B (ApoB)¹³. They showed that using tripodal siRNA leads to double mRNA silencing efficacy (65% drop of ApoB mRNA quantity) comparing to the use of single siRNA (33 % drop of ApoB mRNA quantity) in the mouse liver after a single intravenous injection. Subsequently they record, at 48h post injection, a diminution in LDL serum concentration. Coating the surface of nanoparticles by alternative adsorption of polycations and siRNA was also a successful strategy to obtain a sustained release with prolonged action¹⁴.

We previously developed a composite nanoparticle model based on the same approach. Calcium phosphate nanoparticles were successfully coated with siRNA and PEI-Tyrosine by alternative adsorption, showing a high gene silencing efficacy *in vitro* and *in vivo* on a murine model of xenograft tumour¹⁵. Here, we tested similar composite nanoparticles coated with siRNA and pyridylthiourea-grafted polyethylenimine (π PEI), in a chronic HCV infection model. The decision to change the stabilizing polymer was led by the lower toxicity of π PEI compared to PEI-Tyr although similar results in siRNA complexation^{16,17}. Using host and viral targets, we demonstrate a long-term efficient reduction of HCV replication (over 10 days). Moreover, we demonstrate that the layer-by-layer technique of coating proposed here causes a delayed delivery of the different siRNA. Altogether, these results pave the way to a more comprehensive use of such nanodevices in antiviral therapy.

Results and discussion

Particle formulation and characterization

The particle formulation (CPNp(π PEI/siRNA)_{2,5}) has been done as previously described, using a technique of alternate deposition of π PEI and siRNA directly after calcium phosphate particles (CPNp) precipitation¹⁵. The morphology of the core particles is the same before and after coating (figure S1). The average hydrodynamic diameter after coating is 83 ± 1 nm (Figure S1). The diameter of the particles remains stable over time for at least 8 days in an acetate buffer (Figure S2). Moreover, there is no detectable siRNA release when the particles are incubated in water or in complete serum (Figure S3). Altogether, these results demonstrate that the particles remain stable over time. It has been determined that there is no difference in encapsulation ratio between our previous formulation using PEI-Tyr and the current formulation using π PEI¹⁵.

In vitro particle internalisation

Particle internalisation is of paramount importance for the delivery and efficacy of siRNA. The overall charge of π PEI causes non-specific interactions with the cytoplasmic membrane and promotes non-specific internalisation. Moreover, the presence of tertiary amines in the polymer structure helps overcome particle endocytosis by the so-called proton sponge effect. It leads to an osmotic choc in endolysosome vesicles triggering the release of the particles in the cytoplasm where gene silencing takes place. Although there is no doubt that the particles are internalised, their intracellular localisation and fate are unclear. To address this question, we used TEM and confocal laser scan microscopy imaging (CLSM). Huh7.5.1 human hepatoma cells were maintained in presence of nanoparticles for 4h. After thorough washing to discard all non-

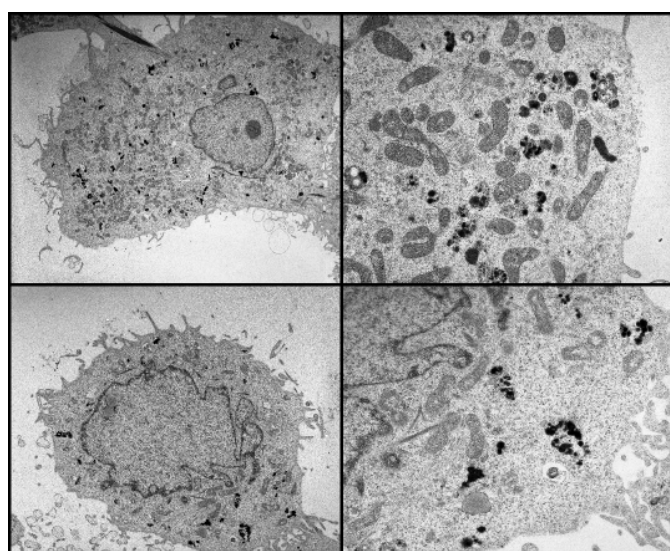


Figure 1: TEM micrograph of Huh7.5.1 cell after 24h (upper panels) or 48 h (lower panels) incubation with CPNp(π PEI/siRNA)_{2,5}.

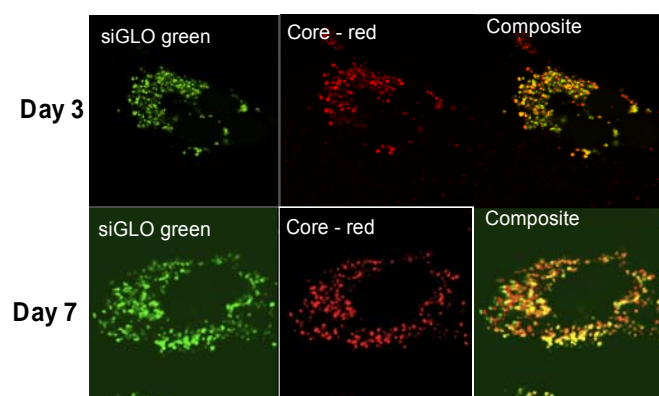


Figure 2: CLSM images of Huh7.5.1 cells after incubation with CPNp(pPEI/siRNA)_{2,5} showing the localisation of Calcium phosphate core particle (red) and siRNA (green). Images were taken at 63X magnification.

internalised particles, cells were grown for an additional 24 or 48h. TEM imaging of cells, 24h and 48h after particle endocytosis, shows that the particles are evenly distributed in the cytoplasm mainly as aggregates (fig 1). As expected, the particles were neither included in vesicles nor associated to membrane. The calcium phosphate core is the only part of the particles that can be visualised by TEM. In order to follow the presence of siRNA, confocal laser scanning microscopy (CLSM) experiments were performed on Huh7.5.1 cells after incubation with nanoparticles containing alizarine complexone in the calcium phosphate core, and FITC labelled siRNA coating. As shown in Figure 2, the core of the particles (red) as well as the siRNA (green) are evenly distributed in the cell cytoplasm, partially co-localised, and can be visualised for at least 7 days. This demonstrates that the siRNA coating of the particle is not released in the cell at once, since fluorescent-labelled siRNA is observed co-localized with the core particle until 7 days post-administration. However, as of now, it is not known if the siRNA complexed with π PEI is still available and/or released over a long period of time.

siRNA delivery and particle toxicity

Intracellular siRNA delivery by composite nanoparticles has been evaluated by quantitative RT-PCR. As shown in Figure 3, a major release of siRNA is detected the first two days after particle internalisation by cells, followed by a decrease of the siRNA concentration detected. siRNA delivery by our particle is related to a burst release following particle entry. When cells are incubated with 200 ng of siRNA none is detected after three days. However by increasing the siRNA concentration to 400 ng about the fourth of siRNA is still detected. Taking into account that this method only detects released siRNA, not siRNA complexed with π PEI, and that siRNA release mechanism should be related to the acidification process in the endolysosome, remaining siRNA detected could be related to the non-complete destruction of siRNA release in first instance. Increasing particle concentration could lead to increasing the time gene silencing could take place. However, this result has to be placed in parallel with the results obtained by CLSM. In these experiments, due to CLSM resolution, we can detect only FITC labelled siRNA that is still complexed with π PEI on the calcium phosphate nanoparticles. Even particle aggregates are more easily detected instead of isolate ones (Fig.2). Increasing particle concentration is so far limited by this aspect as particle or polymer complexes stuck into cell could have some toxicity. The toxicity of the particles was assessed via PrestoBlue® tests. The results are presented in function of the quantity and the sequence targeted by

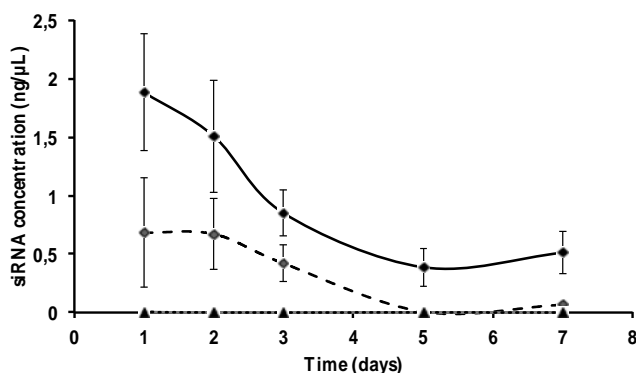


Figure 5: Intracellular siRNA quantification in Huh7.5.1 after 24h incubation with 400ng CPNp(π PEI/siLuc)_{2.5} (black diamonds), 200ng CPNp(π PEI/siLuc)_{2.5} (open diamonds) and 400ng CPNp(π PEI/siGen1)_{2.5} (triangles), siGen1 is a non targeting control siRNA. Quantification was performed by qRT-PCR using TaqMan® Small RNA assays (Life Technologies).

the siRNA in figure 3. No toxicity was ever detected at any concentration tested neither siRNA target. Toxicity in such composite nanoparticle can be driven either by the π PEI itself or by the siRNA. By testing the toxicity of π PEI alone at the highest concentration use afterward, we demonstrate that it is innocuous. We did test in parallel different siRNA to evaluate how a potential off target effect could lead to some cytotoxicity. Indeed, one side effect of gene silencing technology is non-specific interactions between siRNA and non-targeted mRNA. This effect is directly

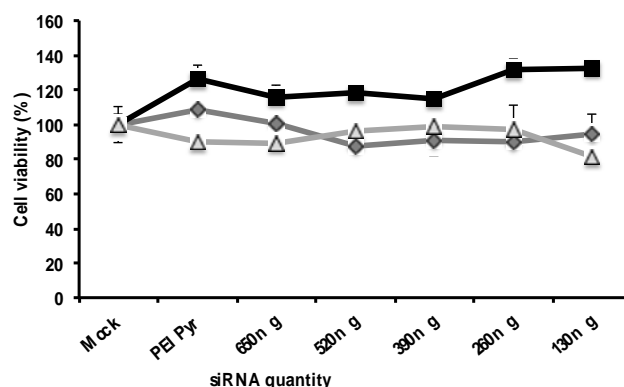


Figure 3: Quantification of Huh7.5.1 cell viability using a PrestoBlue test after 24h incubation at various concentrations of CPNp(π PEI/siRNA)_{2.5} comparing various siRNA : siCD81 (grey diamond), siRack1 (black square) and siapoE (white triangle)

correlated to the sequence and the intracellular concentration of the siRNA. As the consequences of the off-target effect are unpredictable, toxicity can be observed at high doses. Fortunately, this problem can easily be overcome by the use of a mix of siRNA targeting the same gene but with different sequences and at lower doses. With the different siRNA we used in our study, no toxicity was recorded over the time period and the concentrations tested.

Effect of composite nanoparticles on chronic HCV infection in human hepatoma cells

Efficacy of the nanoparticles was tested *in vitro* using cell culture-derived HCV particles (HCVcc). Huh7.5.1 replicating since several days HCV were used to mimic a chronic HCV infection *in vitro*. Three siRNA targeting different molecules were used: one targeting the HCV viral RNA and two targeting host proteins involved in cellular entry or translation/replication steps of the virus life cycle. siHCV targets the viral RNA IRES sequence, leading to direct destruction of the viral RNA. siCD81 targets a major actor of viral entry and therefore is an important target to limit the reinfection process^{18,19}. siRACK1 targets RACK1 that has recently been proven to play a critical role in viral translation and replication, and is therefore highlighted as a major target for antiviral therapy²⁰. First, we assessed nanoparticle efficacy in our model using particles coated with a single siRNA (figure S4). We used the chimeric virus Luc-Jc1 that carries the firefly luciferase reporter gene, as a marker of viral inhibition. This allows to easily detect viral replication, as luciferase expression is proportional to viral replication¹⁸. Transfection of cells with nanoparticles lead to a decrease in HCV replication in a dose dependant manner at three days after transfection regardless of the molecule targeted. siHCV and siRack1

were the most efficient, with a decrease of up to 95% ($\pm 1.2\%$) and 89% ($\pm 7.7\%$) of viral replication respectively, at the highest siRNA concentration (650ng). Higher doses of particles were not tested as they have been shown to be toxic. In all conditions tested, the highest concentrations were equivalent in efficacy to a transfection with a commercial transfection reagent (Dharmafect) used as a positive control. More interestingly, the use of π PEI alone as a delivery platform turned out to be less effective as the nanoparticles. The presence of the calcium phosphate structure increases the inhibition of HCV replication. Similar observations have already been made by Sokolova *et al.* and our results are in accordance with those²¹. Indeed, they show that complexation of polyethyleneimine with calcium phosphate particle increase siRNA delivery.

As combining siRNA has been proven to be an interesting way to increase the efficacy of gene silencing methods during antiviral treatment of infected cells, we prepared nanoparticles coated with a suspension containing two different siRNA instead of a single one. We associated siRACK1 with either siCD81 and recorded an increased efficacy, especially at lower doses (Figure 5). Moreover, using this siRNA combination allows us to target two independent steps of the HCV lifecycle (respectively viral translation^{ref} and viral reinfection and entry^{ref}). For a final quantity of 130 ng of siRNA, the luciferase signal decreases up to 67% ($\pm 18.7\%$) for siCD81/RACK1

mixture, instead of only 42% ($\pm 8.5\%$) with siRACK1 alone and 10% ($\pm 17,1\%$) with siCD81 alone. CLSM experiments suggested that some siRNA could be trapped on the particle. To understand if alternate layering changes the siRNA release sequence, we modified particle coating by alternative deposition of both siRNA, instead of using a mixture of siRNA. We formulated particles coated with five different combinations of siRNA, all containing siRACK1:

CpNP(π PEI/siRack1/ π PEI/siCD81/ π PEI),
CpNP(π PEI/siCD81/ π PEI/siRack1/ π PEI),
CpNP(π PEI/siRack1/ π PEI/siCTRL/ π PEI), and
CpNP(π PEI/siCTRL/ π PEI/siRack1/ π PEI),

CpNP(π PEI/siRack1/siCD81/ π PEI/siRack1/siCD81/ π PEI). All five types of particles were tested as previously. Huh7.5.1 HCV replicating cells were transfected with the particles at various concentrations. Two main parameters were recorded at 3, 6 and 10 days after transfection: Luciferase activity as marker of HCV replication (Fig.5A, 5C, 5E) and RACK1 expression by Western blot analysis (Figure 5B, 5D, 5F).

As observed previously, with a mixture of two siRNA, a decrease of 80% ($\pm 2.1\%$) (D3), 89% ($\pm 4.6\%$) (D6) and 90% ($\pm 3.7\%$) (D10) of HCV replication is observed at the highest siRNA concentration (650ng) (Fig.5A). For the lowest siRNA concentration (130ng), the sequential coated particles present higher inhibition efficiency than the mixture-coated particles (compare Fig.5A and Fig.5E), meaning that

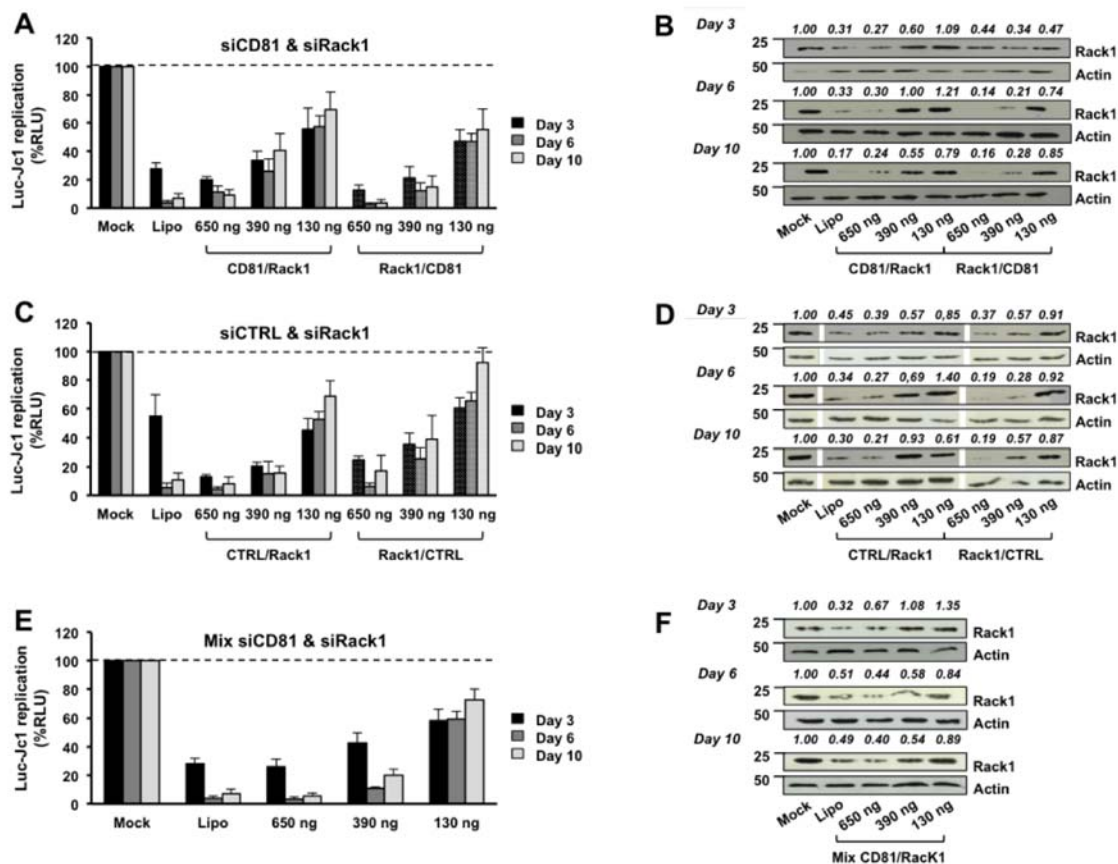


Figure 6: Effect of composite nanoparticles on HCV infection in Huh7.5.1 cells: HCV replicating cells were propagated in complete medium supplemented with 1% DMSO and transfected with various types of particles coated by alternate deposition of siCD81, siRack1 or a non-targeting CTRL. Different combinations of siRNA were tested: siCD81/siRack1 or siRack1/siCD81 (A), siCTRL/siRack1 or siRack1/siCTRL (C) and siCD81/siRack1/siCD81/siRack1 (E). Particles were transfected to obtain 650: 390 or 130 ng of siRNA (final quantity). For each experiment, a control transfection was performed using Lipofectamine RNAiMax transfection protocol, purchased from Life Technologies™ (Carlsbad, CA, USA). Viral replication was assessed at 3, 6 and 10 days post-transfection by measuring luciferase activity. Results are presented as percentage of luciferase activity relative to non-transfected HCV replicating cells (Mock = 100%). Means \pm SD from three independent experiments performed in triplicate are shown. In parallel, silencing efficacy was assessed by Western blot analysis on Rack1 protein (B, D and F). Relative quantifications (Image Jsoftware) are expressed as a ratio apoE/actin (fold).

sequential coating presents a functional advantage.

Interestingly, a decrease of RACK1 protein expression was observed by Western blot for all types of particles. The silencing is maintained up to 10 days after transfection with the two highest concentrations. These results suggest a constant release of siRNA over time. However, the sequence of the coating is important. By comparing RACK1 Western blot profiles, we observe a difference in RACK1 silencing between CpNP(π PEI/siRACK1/ π PEI/siCD81/ π PEI) and CpNP(π PEI/siCD81/ π PEI/siRACK1/ π PEI). When siRACK1 is at the surface of the particle, we observe a decrease of RACK1 three days after transfection for all concentrations, followed by a relapse from day 6, whereas when siRACK1 is close to the core of the particle, we observe a significant decrease of RACK1 expression up to day 10. This is particularly obvious at the intermediate concentration of 390 ng (compare siCD81/siRACK1 and siRACK1/siCD81 in Fig.5B). Such results seem to indirectly prove that the coating process is important to adjust siRNA delivery, and were confirmed with an other set of experiment using siRACK1 and siCTRL (compare siCTRL/siRACK1 and siRACK1/siCTRL in Fig.5D). This observation indicates that siRNA concentration might be decreased in such type of therapy by adapting the protocols. Biological relevance of this observation was further assessed by following HCV infection in the same experimental setting. Interestingly, the activity profiles of CpNP(π PEI/siRACK1/ π PEI/siCD81/ π PEI) and CpNP(π PEI/siRACK1/siCD81/ π PEI/siRACK1/siCD81/ π PEI) over time are quite similar. CpNP(π PEI/siCD81/ π PEI/siRack1/ π PEI) nanoparticles, however, show lower efficiency to reduce HCV infection.

Experimental

Cell line

Human Huh7.5.1 cells were propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% of decomplexed fetal bovine serum, gentamycine (50 μ g/mL) and non-essential amino acids.

RNA interference assays.

Specific siRNA targeting CD81 (siCD81, L-017257-00) and non-targeting control siRNA (siCTRL, D-001810-10-05) were purchased from Dharmacon Inc (Chicago, IL, USA). Specific siRNA targeting CLDN1, siCLDN804, is a mix of 3 siRNA (5'-UGAAGUGUAUGAAGUGCUU-3'; 5'-CACCAAGGCCCUAUCCAAA-3'; 5'-UAACAUUAGGACCUUAGAA-3'). siRNA targeting HCV IRES sequence (siHCV331) was designed by Yokota *et al* (5'-GGUCUCGUAGACCGUGCACTT-3'). Specific siRNA targeting Rack1 (GNB2L1 silencer select, Cat# 4392421, ID: s20340) was purchased from Ambion, Life technologies™ (Carlsbad, CA, USA). Target gene expression was verified by Western blot analysis as described previously²².

Antibodies.

Mouse monoclonal anti- β actin (ab1906) was obtained from Abcam (Paris, France). Mouse monoclonal anti-core (MA1-080) antibody was obtained from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Mouse monoclonal anti-RACK1 (sc-

17754) was obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA 95060, USA). Secondary antibody anti-mouse IgG (NXA931) coupled with HRP was obtained from Amersham, GE Healthcare

HCV production and infectivity.

Plasmid pFK-Luc-Jc1 (Luc-Jc1) construct has been previously described^{18,23,24}. Luc-Jc1 HCV RNA was obtained following T7 *in vitro* transcription of plasmid pFK-Luc-JC1. Luc-Jc1 is a chimeric HCV genome, which consists of J6CF structural proteins segment and JFH1 (Japanese fulminant hepatitis 1) non-structural proteins segment, and carrying the firefly-luciferase reporter gene.

To obtain HCV replicating cells, Huh7.5.1 cells were electroporated with viral Luc-Jc1 virus RNA as described previously²⁴. Three days post-electroporation, Luc-Jc1 replication was assessed in cell lysates using luciferase activity, as previously described²⁵.

Preparation of calcium phosphate nanoparticles.

CPnps were prepared by a wet chemical process using calcium acetate ((CH₃COO)₂Ca) (AR Aldrich) and sodium di-hydrogen phosphate (NaH₂PO₄) (AR, Aldrich). For the precipitation process, 50 mL of NaH₂PO₄ solution at 2 mM, heated at 60,2°C, were added dropwise, at a rate of 2.5 mL min⁻¹, to 60 mL of (CH₃COO)₂Ca (2 mM) and the pH was adjusted to 5.15 by adding sodium acetate 5 mM/acetic acid, heated at 60 \pm 2 °C under constant stirring. After precipitation the CPnp suspension was cooled down to 4 °C for conservation until use.

siRNA and π PEI multilayer coating on nanoparticles.

CPnps were coated by alternated depositions of siRNA and pPEI leading to a polyelectrolyte multilayer (π PEI/siRNA)_{2,5}. The CPnp suspension was kept at 4 \pm 2 °C during the coating process. Before coating, the pH of the CP nanoparticle suspension was adjusted to 5.15. Under constant stirring, 11 mL of π PEI (10 mM N) per 1 mL of suspension was added. CPnps were incubated for 1 h in the presence of π PEI. Then 1.3 mg of siRNA (1 mg.mL⁻¹) per mL of CPnp suspension (0.02% p/v) was added. CPnps were incubated for 1 h in the presence of siRNA. These steps were repeated 2 times to obtain a typical (π PEIY/siRNA)_{2,5} coating at the surface of the nanoparticles. After completion of the coating, CPnp(π PEIY/siRNA)_{2,5} were kept at 4 °C until use.

DLS and zeta potential measurements.

The apparent size and surface charges of the various coated nanoparticles were determined via dynamic light scattering (DLS) measurements using a NanoZS apparatus (Malvern instruments, Paris, France) with the following specifications: sampling time 90 s; refractive index of the medium 1.3402; refractive index of particles 1.47; medium viscosity 1.145 cP and temperature 25 °C. Data were analyzed using the multimodal number distribution software included with the instrument.

Electron microscopy

Huh7.5.1, seeded at 1.10^5 cells per cm on glass coverslips (14mm diameter) 12 h prior the experiment, were incubated with CPnp(π PEI/siRNA)_{2,5} at a concentration of 400 ng per well. At various time, cells were fixed in 2% PFA-2% glutaraldehyde in 50 mM cacodylate buffer at pH 7.4 for 2 h. Cells were fixed in 1% osmium tetroxide in 125 mM cacodylate for 30 min. Samples were dehydrated in solutions with gradually increasing concentration of ethanol content (50, 70, 95, and 100% three times) for 15 min each. Cells were included in epoxy resin (48.2% epon 812, 34% anhydride nadic methyl, 16.4% anhydride [2-dodeceny] succinic, and 1.5% 2,4,6-tris dimethylaminoethyl] phenol) for 48 h at 60° C. After resin polymerization, in order to be able to cut them, a heat shock was first performed to remove glass coverslips. To obtain sagittal sections of cells, the cutting surface was reoriented with preparing small block using circular saw (Bronwill Scientific, USA) and sticks them on new ones. Ultra-thin cross sections (100 nm) were performed using an automatic ultramicrotome (Ultracut-E Ultramicrotome, Reichert Jung, USA). Sections were stained by 5% uranyl acetate for 20 min and 4% lead citrate. The specimens were observed with a transmission electron microscope EM208 (FEI Compagny, Philips, Netherlands) operating with an accelerating voltage of 70 kV. Images were captured on argentic SO163 Kodak films.

Confocal laser scanning microscopy

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) observations were carried out with a Zeiss LSM 510 microscope using a 63 \times (Zeiss Achromplan) objective and with 0.4 μ m z-section intervals. FITC fluorescence was detected after excitation at $\lambda = 488$ nm with a cut-off dichroic mirror of 488 nm and an emission band-pass filter of 505–530 nm (green emission). Alizarin complexone fluorescence was detected after excitation at $\lambda = 543$ nm, dichroic mirror of 543 nm, and an emission long pass filter of 585 nm (red emission).

Nanoparticles transfection

• HCV replicating cells transfection

Huh7.5.1 chronically replicating HCV were propagated in complete medium. CPnp were diluted in fresh medium to obtain 650 ng, 520 ng, 390 ng, 260 ng and 130 ng of siRNA (final quantity) and added to the HCV replicating cells. Cells were lysed 3 days later and viral infection was assessed by measuring luciferase activity. For each experiment, transfection controls were performed using a mix of 12 nmol of π PEI polymer and 650 ng of siRNA (π PEI) and by transfecting cells with the different siRNA with a commercially available transfection reagent (DF = Dharmafect, purchased from Dharmacon Inc.).

• Kinetic

HCV replicating Huh7.5.1 cells were propagated in complete medium supplemented with 1% of DMSO to decrease cell proliferation. CPnp were diluted in medium plus DMSO to obtain 650 ng, 390 ng or 130 ng of siRNA (final quantity) and added to the HCV replicating cells. Cells were lysed at 3, 6 or

10 days after CPnp transfection to measure HCV replication by luciferase assay.

For each experiment, a negative control was performed using 12 nmol of π PEI polymer added in the culture medium of Huh7.5.1 cells and a control of transfection was performed by transfecting siRNAs with a commercially available transfection reagent (Lipofectamine, purchased from Life Technologies™ (Carlsbad, CA, USA)).

Cell viability assay

CPnp toxicity was assessed using PrestoBlue® Cell Viability Reagent purchased from Life Technologies™ (Carlsbad, CA, USA), according to manufacturer's instructions. Briefly, PrestoBlue® reagent was added volume-to-volume in cell culture medium of transfected or control Huh7.5.1. After 1h at 37°C, absorbance was measured at 570 nm and 600nm (reference wavelength) using a microplate reader (Mithras LB 940, Berthold Technologies).

Statistics

Data sets were analyzed using the Mann-Whitney test. $p < 0.05$ and 0.01 were considered statistically significant. Significant p values are indicated by asterisks in the individual figures: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

Conclusions

Our composite nanoparticles made by alternate deposition of siRNA and π PEI proved to be efficient in controlling HCV replication with up to 90 % reduction over 10 days. Efficacy is directly related both to the type of siRNA, therefore the intracellular pathway targeted, and more interestingly the design of the deposition. Here we show that the use of calcium phosphate particles improve transfection efficacy of π PEI and we confirm the works previously done by other teams using PEI. It thus pave the way to a better understanding of PEI transfection that is still believe to be the best candidate for synthetic transfection in the frame of therapeutic approaches. Moreover the results presented here show that sequential siRNA deposition leads to sequential release. Then, aside the use in antiviral therapy, this type of particle could be useful for screening of various pathways in the viral cycle in a time dependant assay to decipher potent targets for future HCV or other chronic viral infection (i.e. Hepatitis B), as well as cell circuits leading to cancer.

Acknowledgements and fundings

The authors thank Eric Matthieu for TEM imaging, Benoît Frisch and Guy Zuber for kindly providing π PEI. R.S acknowledge the university of Strasbourg and the Région Alsace for funding. TFB and FM acknowledge funding through ARC Foundation/IHU Strasbourg TheraHCC program. This work was financially supported by IHU Mixsurg Strasbourg and

“Association de Recherche contre le cancer” (ARC, project NanoISI). This work has been published under the framework of the LABEX HepSYS [ANR-10-LABX-0028] and benefits from funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the Investments for the future program. E. C. was supported by a fellowship of the French Ministry for Research and Education (MESR). C. Schuster acknowledges funding by the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) (2010-307/2011-415) and the Initiative d'excellence (IdEx) program from the University of Strasbourg.

Notes and references

1. Imran, M. *et al.* Current and future therapies for hepatitis C virus infection: from viral proteins to host targets. *Arch Virol* **159**, 831–846 (2013).
2. Barik, S. & Lu, P. Therapy of respiratory viral infections with intranasal siRNAs. *Methods Mol. Biol.* **1218**, 251–262 (2015).
3. Moon, J.-S. *et al.* Inhibition of Hepatitis C Virus in Mice by a Small Interfering RNA Targeting a Highly Conserved Sequence in Viral IRES Pseudoknot. *PLoS ONE* **11**, e0146710 (2016).
4. Zeisel, M. B., Crouchet, E., Baumert, T. F. & Schuster, C. Host-Targeting Agents to Prevent and Cure Hepatitis C Virus Infection. *Viruses* **7**, 5659–5685 (2015).
5. Sarett, S. M., Nelson, C. E. & Duvall, C. L. Technologies for controlled, local delivery of siRNA. *J Control Release* **218**, 94–113 (2015).
6. Lee, C. H., Kim, J. H. & Lee, S.-W. Prospects for nucleic acid-based therapeutics against hepatitis C virus. *World J. Gastroenterol.* **19**, 8949–8962 (2013).
7. Seok, H., Jang, E.-S. & Chi, S. W. Rationally designed siRNAs without miRNA-like off-target repression. *BMB Rep* (2016).
8. Alagia, A. & Eritja, R. siRNA and RNAi optimization. *Wiley Interdiscip Rev RNA* (2016). doi:10.1002/wrna.1337
9. Chandra, P. K. *et al.* Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Intracellular Delivery of Multiple siRNAs by Nanosomes. *Mol Ther* **20**, 1724–1736 (2012).
10. McDonagh, P., Sheehy, P. A. & Norris, J. M. Combination siRNA therapy against feline coronavirus can delay the emergence of antiviral resistance in vitro. *Vet. Microbiol.* **176**, 10–18 (2015).
11. Li, G. *et al.* siRNA combinations mediate greater suppression of hepatitis B virus replication in mice. *Cell Biochem. Biophys.* **69**, 641–647 (2014).
12. Grimm, D. *et al.* Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**, 537–541 (2006).
13. Sajeesh, S. *et al.* Efficient intracellular delivery and multiple-target gene silencing triggered by tripodal RNA based nanoparticles: a promising approach in liver-specific RNAi delivery. *J Control Release* **196**, 28–36 (2014).
14. Lee, S. K. & Tung, C.-H. A fabricated siRNA nanoparticle for ultra-long gene silencing in vivo. *Adv Funct Mater* **23**, 3488–3493 (2013).
15. Devarasu, T. *et al.* Potent calcium phosphate nanoparticle surface coating for in vitro and in vivo siRNA delivery: a step toward multifunctional nanovectors. *J. Mater. Chem. B* **1**, 4692–4700 (2013).
16. Creusat, G. *et al.* Pyridylthiourea-grafted polyethylenimine offers an effective assistance to siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *J Control Release* **157**, 418–426 (2012).
17. Pinel, S. *et al.* Quantitative measurement of delivery and gene silencing activities of siRNA polyplexes containing pyridylthiourea-grafted polyethylenimines. *J Control Release* **182**, 1–12 (2014).
18. Koutsoudakis, G. *et al.* Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J. Virol.* **80**, 5308–5320 (2006).
19. Chang, K.-S., Jiang, J., Cai, Z. & Luo, G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J. Virol.* **81**, 13783–13793 (2007).
20. Majzoub, K. *et al.* RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell* **159**, 1086–1095 (2014).
21. Sokolova, V. *et al.* An outer shell of positively charged poly(ethyleneimine) strongly increases the transfection efficiency of calcium phosphate/DNA nanoparticles. *J. Mater. Sci.* **45**, 4952–4957 (2010).
22. Benga, W. J. A. *et al.* Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **51**, 43–53 (2010).
23. Pietschmann, T. *et al.* Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C

virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 7408–7413 (2006).

24. Zeisel, M. B. *et al.* Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* **46**, 1722–1731 (2007).

25. Lee, J.-Y. *et al.* Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins. *J. Virol.* **88**, 12422–12437 (2014).

ANNEXES

N°2 : Host-targeting agents to prevent and cure hepatitis C infection

Review

Host-Targeting Agents to Prevent and Cure Hepatitis C Virus Infection

Mirjam B. Zeisel ^{1,2,*}, Emilie Crouchet ^{1,2}, Thomas F. Baumert ^{1,2,3} and Catherine Schuster ^{1,2,*}

Received: 25 September 2015 ; Accepted: 19 October 2015 ; Published: 2 November 2015

Academic Editor: Eric O. Freed

¹ Inserm, U1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, 67000 Strasbourg, France; emilie.crouchet@etu.unistra.fr (E.C.); thomas.baumert@unistra.fr (T.F.B.)

² Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

³ Institut Hospitalo-Universitaire, Pôle Hépato-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

* Correspondence: mirjam.zeisel@unistra.fr (M.B.Z.); catherine.schuster@unistra.fr (C.S.); Tel.: +33-3-68-85-37-03; Fax: +33-3-68-85-55-08

Abstract: Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) which are leading indications of liver transplantation (LT). To date, there is no vaccine to prevent HCV infection and LT is invariably followed by infection of the liver graft. Within the past years, direct-acting antivirals (DAAs) have had a major impact on the management of chronic hepatitis C, which has become a curable disease in the majority of DAA-treated patients. In contrast to DAAs that target viral proteins, host-targeting agents (HTAs) interfere with cellular factors involved in the viral life cycle. By acting through a complementary mechanism of action and by exhibiting a generally higher barrier to resistance, HTAs offer a prospective option to prevent and treat viral resistance. Indeed, given their complementary mechanism of action, HTAs and DAAs can act in a synergistic manner to reduce viral loads. This review summarizes the different classes of HTAs against HCV infection that are in preclinical or clinical development and highlights their potential to prevent HCV infection, e.g., following LT, and to tailor combination treatments to cure chronic HCV infection.

Keywords: hepatitis C virus; host-targeting agent; direct-acting antiviral; viral resistance

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is a hepatotropic enveloped RNA virus of the *Flaviviridae* family. It is a highly variable virus that has been classified into six major genotypes [1]. Approximately 170 million individuals worldwide are infected by HCV. Chronically HCV-infected individuals are at risk for developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) which are major indications for liver transplantation (LT). There is no vaccine to prevent HCV infection and, until recently, antiviral therapy (based on pegylated (PEG) interferon (IFN) alpha and ribavirin) only enabled a cure for less than half of the patients, with strong differences in treatment outcome depending on the genotype. Within the past years, with the sequential approval of novel antivirals specifically targeting viral proteins (direct-acting antivirals (DAAs)), chronic hepatitis C has become a curable disease in the majority of treated patients and the most recent DAAs act in a pan-genotypic manner (reviewed in [2]). Several novel antivirals are in late-stage clinical development and will further broaden the therapeutic arsenal against HCV and enable the tailoring of combination treatments for distinct patient groups.

Antivirals can be classified into two distinct categories depending on whether they target viral proteins, *i.e.*, DAAs, or interfere with cellular factors involved in viral infection, *i.e.*, host-targeting

agents (HTAs). For many years, HCV-host interactions have remained largely elusive due to the lack of robust model systems, and anti-HCV drug development has paralleled discoveries about the molecular mechanisms of viral replication. Indeed, the establishment of increasingly sophisticated model systems to study HCV infection (reviewed in [3–5]) has enabled researchers to characterize the molecular mechanisms underlying the HCV life cycle in great detail (reviewed in [6–9]) and to design a wide variety of antivirals targeting various steps of the viral replication cycle (reviewed in [8,10]). While several HTAs had been developed to characterize the HCV replication cycle and corroborate the importance of defined host factors for distinct steps of viral infection, others have been uncovered through functional screening approaches aimed at repurposing existing small molecules/approved drugs [11–13]. This review summarizes the different classes of HTAs against HCV infection and highlights their potential for antiviral therapy to prevent viral resistance.

2. HTAs to Inhibit Various Steps of the HCV Life Cycle

The HCV life cycle can be subdivided into five different steps, including viral entry, viral translation, viral replication, viral assembly, and release of new virions. Each of these steps requires defined virus-host interactions to ultimately enable the virus to establish chronic infection. Given the amount of host factors involved in the HCV life cycle, this review solely focuses on some of these host factors that have been suggested to represent potential targets for HTAs during distinct steps of the HCV life cycle within hepatocytes (Figure 1). Other compounds exhibiting a broader mechanism of action by modulating the host's immune responses, also termed biological response modifiers (Table 1), such as IFNs, Toll-like receptor (TLR) 7, or TLR9 agonists [14–17], are not reviewed in detail here.

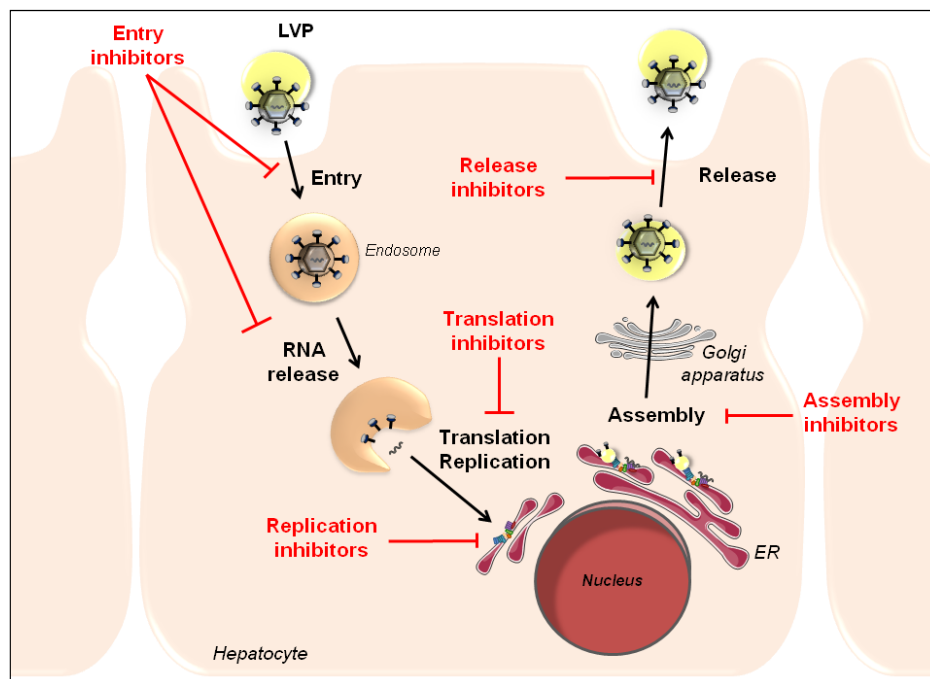


Figure 1. Schematic representation of the hepatitis C virus (HCV) life cycle and targets for antiviral therapy. HCV interacts with the basolateral membrane of hepatocytes, resulting in viral entry into the host cell. The virus is internalized *via* endocytosis and translation of the HCV RNA occurs in the cytoplasm following viral fusion and uncoating. Viral replication takes place within the cytoplasm in perinuclear endoplasmic reticulum (ER)-derived membranes called the “membranous web”. Progeny virions are assembled on cytosolic lipid droplets and subsequently transported along the secretory pathway and matured in the Golgi before their release through microtubular transport and endocytic recycling compartment. Targets for antiviral therapy are highlighted in red.

Table 1. Stage of development of host-targeting agents (HTAs) for prevention and/or treatment of HCV infection. Only HTAs having at least reached *in vivo* preclinical development are listed.

Category	Target	Compounds	Stage of Development	References
Entry inhibitors	CD81	mAbs	Mouse model	[18]
	SR-BI	mAbs	Mouse model	[19–21]
		ITX-5061	Phase 1	[22,23]
	CLDN1	mAbs	Mouse model	[24]
	EGFR	Erlotinib	Phase 1/2	NCT01835938
	NPC1L1	Ezetimide	Mouse model	[25]
	Endocytosis/fusion		Silymarin/silibinin	Phase 2/3
Chloroquine			Phase 4	NCT02058173
Translation inhibitors	miR-122	Miravirsen	Phase 2	[28,29]
Replication inhibitors	miR-122	Miravirsen	Phase 2	[28,29]
	HMGCoA reductase	Statins	Phase 3	[30,31]
		Alisporivir	Phase 2/3	[32]
	Cyclophilin	SCY-635	Phase 2	[33]
		NIM811	Phase 2	[34]
Assembly inhibitors	α -glucosidase 1	Celgosivir	Phase 2	[35]
	DGAT-1	LCQ908	Phase 2	NCT01387958
	Cyclophilin	NIM811	Phase 2	[34]
	PPAR α	Naringenin	Phase 1	[36]
	HNF4 α	Bezafibrate	Phase 4	[37]
Biological response modifiers	Immune responses	IFN- α	FDA-approved	www.hcvguidelines.org
		IFN- λ	Phase 3	NCT01795911
		TLR7 agonist	Phase 1	[15,16]
		TLR9 agonist	Phase 3	[17]
		Thymosin α 1	Phase 3	[38]
		Nitazoxanide	Phase 2	[39,40]

mAbs: monoclonal antibodies, EGFR: epidermal growth factor receptor; IFN : interferon; TLR : Toll-like receptor; CLDN1: claudin 1; CD81 : cluster of differentiation 81; SR-BI: scavenger receptor class B type I; NPC1L1: Niemann-Pick C1-Like 1; HMGCoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A; DGAT-1: diacylglycerol O-acyltransferase 1; PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor alpha; HNF4 α : hepatocyte nuclear factor 4 alpha. FDA: Food and Drug Administration; miR-122: microRNA-122

2.1. Entry Inhibitors to Prevent Initiation of Viral Infection and Viral Dissemination

The HCV entry process has been particularly well characterized within the past years (for a review see [6]). The initial viral attachment on the hepatocyte cell surface is believed to involve the interaction of the viral particle with heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) [41–46], particularly with syndecan 1 (SDC1) [47] and syndecan 4 (SDC4) [48], low density lipoprotein receptor (LDLR) [49–53], and scavenger receptor class B type I (SR-BI) [54–59]. Interestingly, both viral (HCV envelope glycoproteins) and host-derived (apolipoproteins) factors within the viral particle appear to mediate this process (reviewed in [6,60]). Thus, the very first steps of viral interaction with the host cell surface can be inhibited by targeting host factors expressed either on the viral particle or on the host cell membrane (Figure 2). Indeed, it has been shown that synthetic anti-lipopolysaccharide peptides that bind to heparan sulfate moieties on the cell surface as well as antibodies directed against SR-BI or LDLR inhibit HCV attachment/infection [53,59,61]. Likewise, peptides that mimic the receptor binding domain and the HSPG binding domain of apolipoprotein E (apoE) inhibit HCV infection [45,48] and antibodies directed against apoE [45,62,63] as well as preincubation of recombinant cell culture-derived HCV (HCVcc) with soluble LDLR have also been shown to neutralize HCV infection, likely at the attachment/entry level [53,64]. Recently, it has been suggested that low-molecular-weight lignin, a component of *Lentinula edodes* mycelia solid culture

extract, that has been reported to exhibit hepatoprotective activity, might inhibit HCV attachment through binding to apoE on the viral particle [65] given the structural similarity between lignin sulfate and heparan sulfate [66]. Interestingly, lipoprotein lipase (LPL) increases HCV attachment to the target cell by bridging virus-associated lipoproteins and cell surface heparan sulfate, whereas antibodies as well as a small molecule inhibitor-targeting LDLR have been shown to decrease HCV uptake [67,68]. In addition to its bridging function, LPL has been shown to inhibit viral entry by immobilizing the virus at the cell surface [64,69]. Most recently, it has been shown that very low-density lipoprotein (VLDL) is a serum component that inhibits HCV attachment [70].

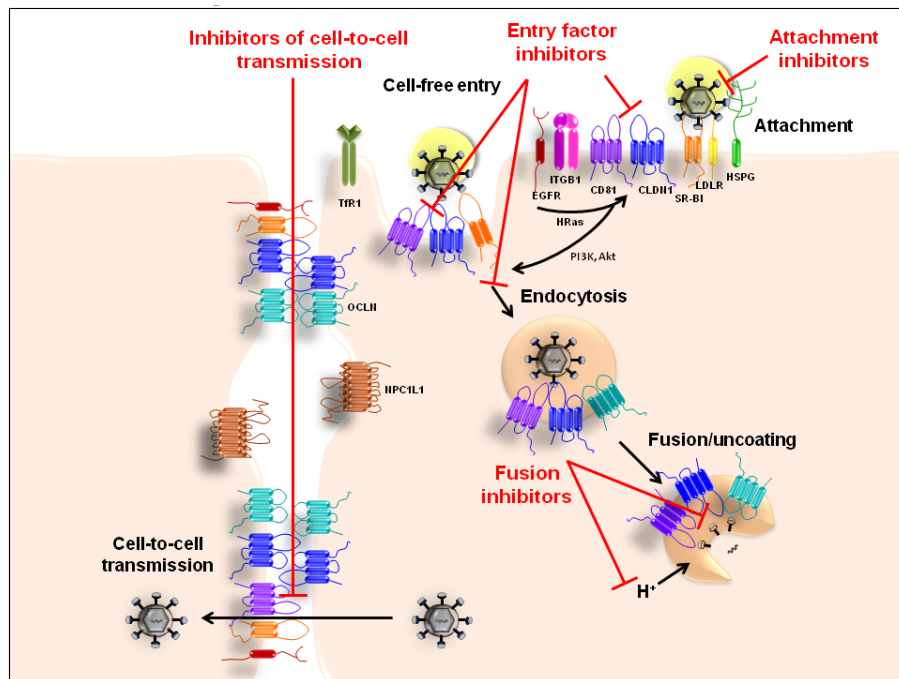


Figure 2. Schematic representation of HCV entry. The initial viral attachment on the basolateral membrane of hepatocytes is believed to involve the interaction of the viral particle—both viral (HCV envelope glycoproteins) and host-derived (apolipoproteins) factors—with HSPGs (heparan sulfate proteoglycans), LDLR (low density lipoprotein receptor) and SR-BI (scavenger receptor class B type I). Following interaction between the virus and different host factors expressed at the hepatocyte cell surface, including CD81 (cluster of differentiation 81) and CLDN1 (claudin 1), as well as rearrangement of cell surface proteins, the virus is ultimately internalized into its host cell *via* clathrin-mediated endocytosis. Additional host factors, including EGFR (epidermal growth factor receptor), NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1) and Tfr1 (transferrin receptor 1), contribute to the HCV entry process, for example by modulating intracellular signaling pathways or endocytosis. Following acidification of the endosome and subsequent fusion of viral and endosomal membranes, the viral genome is released into the cytoplasm. In addition to cell-free virus entry, HCV has also been described to transmit between hepatocytes through direct cell-to-cell transmission involving CD81, SR-BI, CLDN1, OCLN (occludin), EGFR, EphA2 (ephrin receptor A2) and NPC1L1. HTAs can interfere with different steps of the HCV entry process as highlighted in red.

Following initial attachment to the hepatocyte basolateral membrane, the virus interacts with additional host factors expressed at the hepatocyte cell surface to ultimately enter its host cell *via* clathrin-mediated endocytosis. It is believed that the interaction of the HCV envelope glycoproteins E1 and E2 with SR-BI, CD81, CLDN1 and potentially OCLN plays a major role in this process and some of these host factors have thus been suggested to play the role of “HCV receptors” [54,71–75]. Cluster of differentiation 63 (CD63) may also directly interact with HCV E2 and contribute to HCV entry [76]. Of note, additional host factors, termed “co-factors”, including various kinases,

e.g., epidermal growth factor receptor (EGFR), ephrin receptor A2 (EphA2), AP-2-associated protein kinase 1 and cyclin G-associated kinase (GAK), as well as Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) and transferrin receptor 1 (TfR1), also contribute to the HCV entry process, for example by modulating intracellular signaling pathways or endocytosis [25,77–79]. Indeed, downstream EGFR signaling pathways including the GTPase Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (HRas) have been shown to be required for HCV entry, particularly for the formation of the CD81-CLDN1 co-receptor complex that is essential for this process (reviewed in [80]). Thus, HCV entry can be efficiently inhibited using antibodies, peptides or other molecules binding to SR-BI, CD81, CLDN1, EGFR and TfR1 as well as small molecule inhibitors of EGFR, EphA2, GAK, NPC1L1 and HRas [25,77,78,81–96] (Figure 2). Furthermore, host antiviral immune responses may also contribute to inhibiting HCV entry by interfering with the viral entry process as demonstrated by the inhibition of the EGFR kinase activity and, consequently, CD81-CLDN1 co-receptor formation *via* induction of IFN- α inducible protein 6 (IFI6), an IFN-stimulated gene (ISG) [97].

Following internalization *via* clathrin-mediated endocytosis, the viral genome is released into the cytoplasm after fusion of viral and endosomal membranes. In addition to some of the compounds described above, HCV endocytosis and/or fusion can be efficiently perturbed using amphipathic DNA polymers and small molecules including two anti-malaria drugs (chloroquine, ferroquine), arbidol and silymarin/silibinin [98–103] (Figure 2). Of note, in addition to its interference with HCV entry, silymarin/silibinin-derived compounds and chloroquine have also been reported to interfere with viral replication [100,104,105].

In addition to cell-free virus entry, HCV has been shown to also directly infect neighboring hepatocytes via a process called cell-to-cell transmission [106–108]. In contrast to the cell-free HCV entry described above, HCV cell-to-cell transmission is resistant to most of the neutralizing antibodies described so far and is thus believed to play a major role in the maintenance of chronic infection. Although the detailed molecular mechanisms remain to be uncovered, it has been reported that the HCV envelope glycoproteins and apoE on the virus particle as well as CD81, SR-BI, CLDN1, OCLN, EGFR, EphA2 and NPC1L1 on the host cell play an important role for cell-to-cell transmission [19,24,25,77,92,106–108] (Figure 2). Of note, it has been described that HCV can circumvent CD81 and SR-BI for this process [108,109]. However, the potential consequences for antiviral therapy targeting entry factors remain unknown (also see Section 3 below). Notably, viral variants that appear not to require SR-BI for their *in vitro* infectivity remain sensitive to SR-BI-specific antibodies *in vivo*, as demonstrated using the human liver-chimeric uPA-SCID mouse model [20].

Host-targeting entry inhibitors (HTEIs) including antibodies directed against host entry factors or co-factors as well as small molecule inhibitors have proven to efficiently prevent/delay HCV infection in the human liver-chimeric uPA-SCID mouse model [18,24,25,99,110,111], and, thus, may represent a valuable strategy to prevent liver graft infection following LT. Furthermore, they may also contribute to treatment of chronic hepatitis C since an antibody targeting CLDN1 has recently been shown to cure chronic HCV infection in human liver-chimeric uPA-SCID mice in the absence of detectable toxicity [24]. Finally, their combination with other HTAs and/or DAAs can result in a synergistic antiviral activity [21], which provides perspectives for novel combination therapies for the cure of chronic hepatitis C (also see Section 3 below). Collectively, these data highlight the potential of HTEIs not only for prevention of HCV infection, e.g., during LT, but also for treatment of chronic hepatitis C. Of note, a phase 1/2 clinical trial evaluating erlotinib, a clinically licensed EGFR inhibitor used in cancer therapy, has been initiated in chronic HCV patients (<https://clinicaltrials.gov/>; Identifier: NCT01835938). Furthermore, silymarin/silibinin-derived compounds have been evaluated in phase 2/3 clinical trials and (case) reports suggest their efficacy in decreasing viral loads in chronic HCV patients and prevention of hepatitis C recurrence after LT, although other studies reported viral rebounds [26,112–115]. Whether this potential effect is (partially) due to silymarin/silibinin's interference with viral entry remains to be defined. While the efficacy of chloroquine for treatment of non-response HCV patients is currently being evaluated

in a phase 4 clinical trial (<https://clinicaltrials.gov/>; Identifier: NCT02058173), no clinical trial of ferroquine in hepatitis C patients has been registered so far.

2.2. Translation Inhibitors to Prevent Subsequent Viral Replication

Following viral endocytosis and fusion, HCV RNA is translated in an internal ribosome entry site (IRES)-mediated manner. The highly conserved IRES is located in the 5'-untranslated region (5'-UTR) of the viral genome [116,117]. HCV can thus directly recruit the translation initiation complex to the viral RNA to trigger viral protein translation *via* a cap-independent mechanism. The HCV IRES binding to the 40S ribosomal subunit is independent of canonical or non-canonical initiation factors. Moreover, HCV translation initiation only requires eukaryotic initiation factors (eIF) eIF2, eIF3 and eIF5 [118,119]. In contrast, optimal IRES activity is supported by the recruitment of several host proteins named IRES transacting factors (ITAFs) (for a review, see [7]), which represent a novel target for therapeutic intervention. Indeed, a synthetic peptide corresponding to the N-terminal 18 amino acids of the La antigen (efficiently blocks HCV translation by binding and sequestering other ITAFs [120].

IRES-ribosome interaction has been shown to be mediated through the binding of the 40S subunit to the stem loop III, domain e and f (SLIIIef), of the HCV IRES. A recent study demonstrated that a small RNA mimicking the SLIIIef domain (SLRef) selectively inhibits HCV translation by retaining the ability to interact with the 40S subunit. Interestingly, in line with previous studies, it was shown that the anti-HCV activity of SLRef could be mainly due to interaction and sequestration of the La antigen [121]. Ribosome-HCV IRES association can also be disturbed by prostaglandin A1 (PGA1) which exhibits dose-dependent inhibitory effects on HCV translation [122]. Indeed, its antiviral effect occurs through PGA1/eIF3-40S subunit/HCV IRES RNA complex formation which inhibits HCV IRES-mediated translation. Furthermore, repetitive PGA1 treatment appears to be safe in cell culture [122]. The *in vivo* efficacy of molecules interfering with HCV IRES-ribosome association remains to be determined.

Furthermore, microRNA-122 (miR-122) plays an important role in HCV translation. MiR-122, one of the most abundant liver-expressed miRNAs, binds to the HCV genome and enhances viral translation and replication [123,124]. Sequestering miR-122 using miravirsin, a locked nucleic acid-modified oligonucleotide complementary to the 5'-end of miR-122, showed prolonged and dose-dependent reduction in HCV viremia in patients without evidence of long-term safety issues [28,29] (also see Section 2.4 below).

Recently, the receptor for activated C kinase 1 (RACK1), a component of the ribosomal 40S subunit [125,126], was identified as an essential factor for HCV IRES-mediated translation [127]. Interestingly, RACK1 is not required for the classical cap-dependent translation and inhibition of RACK1 expression in cell culture models did not reveal major toxicity [127]. Thus, the development of RACK1 inhibitors may be an attractive perspective for future anti-HCV therapy.

2.3. Replication Inhibitors to Inhibit Viral Genome Amplification

Following translation and cleavage of the HCV polyprotein, the viral replicase complex, composed of HCV non-structural (NS) proteins, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B, is assembled. HCV replication is a highly coordinated process involving host factors in addition to the replicase complex. Several functional small interfering RNA (siRNA) and chemical screens have been performed to uncover host factors involved in HCV replication and have provided useful insights into this process [128–135].

HCV has been demonstrated to remodel intracellular membranes, including endoplasmic reticulum (ER) membranes, for its replication and this process takes place at the so-called “membranous web” [136]. Indeed, HCV NS proteins induce the formation of double-membrane vesicles [136–139]. It has been suggested that this process may be linked to the activation of the autophagy pathway [140], a cellular catabolic process where protein aggregates and damaged

organelles are removed for recycling. Indeed, several studies suggested that HCV activates the autophagic pathway to support its replication (reviewed in [141,142]). Moreover, HCV replication has been reported to occur on autophagosomal membranes [140,143]. This may enable the virus to conceal its RNA and evade double-stranded RNA-triggered host antiviral responses [140]. Chloroquine has been described as an inhibitor of autophagic protein degradation and, in addition to inhibiting HCV entry by modulating endosomal acidification [98], chloroquine has been shown to reduce HCV replication [105]. Host proteins have also been reported to contribute to the formation of double-membrane vesicles (reviewed in [144]), e.g., cyclophilin A (CypA), which interacts with NS5A, and proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2 (PSTPIP2), which interacts with NS4B and NS5A [145,146]. The importance of CypA for the HCV life cycle has recently been underscored in a humanized mouse model of HCV infection in which the *Ppia* gene had been knocked out [147]. In addition to CypA, several other cyclophilins (Cyps) have been reported to also contribute to HCV replication [128,148–150]. Cyclosporines are classical Cyp inhibitors; however, their immunosuppressive properties preclude their use as antivirals. Within the past years, several alternative Cyp inhibitors have been generated: cyclosporine A (CsA) derivatives without immunosuppressive properties and new molecules structurally unrelated to CsA (reviewed in [151]). Cyp inhibitors were the first class of HTAs against HCV reaching clinical development. Three non-immunosuppressive Cyp inhibitors have so far demonstrated clinical efficacy in chronic hepatitis C patients in IFN-based as well as IFN-free treatment regimens [32,151]. These Cyp inhibitors have been shown to disrupt/prevent the formation of CypA-NS5A complexes and thereby inhibit HCV replication [33,151–154]. In addition, the anti-HCV activity of CypA inhibitors may be increased since they appear to restore the host innate immune responses to HCV [33].

NS5A is a central player within the membranous web as it interacts with a plethora of host factors, thereby orchestrating viral replication. The lipid kinase phosphatidylinositol-4-kinase III alpha (PI4KIII α) is one of the major NS5A partners in this process [155]. Indeed, NS5A binds to and activates PI4KIII α and this, in turn, regulates the phosphorylation status of NS5A [156]. PI4KIII α activity leads to phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) accumulation within the membranous web and likely the subsequent recruitment of cellular lipid transporters leading to the modulation of its lipid content (reviewed in [144]). In the absence of PI4KIII α activity or through alteration of its interaction with NS5A, changes in the ultrastructural morphology of the membranous HCV replication complex were observed [132,155,156]. PI4KIII β has also been reported to contribute to the replication of HCV genotype 1 but not genotype 2 [157,158]. PI4KIII inhibitors able to reduce HCV replication *in vitro* have been developed, but their *in vivo* toxicity as well as the lethal phenotype of transgenic mice exhibiting kinase-defective PI4KIII α preclude their further clinical development as antivirals [134,158–161]. As stated above, the host cell lipid metabolism plays an important role in the HCV replication complex [162]. Particularly elements of cholesterol and fatty acid synthesis and geranylgeranylation of host proteins have been shown to modulate viral replication. Indeed, several genes involved in lipid metabolism have been reported to be modulated during acute HCV infection of chimpanzees [163]. HCV replication can be disrupted *in vitro* by treatment with inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMGCoA) reductase or with an inhibitor of protein geranylgeranyl transferase I [164,165]. Notably, not all HMGCoA reductase inhibitors affect HCV replication, suggesting the existence of a different structure-activity relationship between the anti-HMGCoA reductase activity and the antiviral activity [166]. Fluvastatin is a statin that has been reported to increase the efficacy of IFN-based treatment in chronic HCV-infected patients [30,31,167,168]. Recent *in vitro* studies have provided novel insights into the mechanism of action of fluvastatin. The anti-HCV effect of fluvastatin has been suggested to be due to the induction of microtubule bundling and a decrease of expression of the microtubule binding partner doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) [169]. Furthermore, fluvastatin and other statins exhibiting an antiviral effect against HCV induce the expression of heme oxygenase-1 (HO-1), which has been reported to reduce HCV replication [170–173]. HMGCoA reductase activity can

also be inhibited using SKI-1/S1P inhibitors [174,175]. In addition to inhibiting HCV replication, SKI-1/S1P inhibitors may also reduce the production of new virions [174]. Interestingly, it has also been reported that antibody-mediated blocking of the LDLR leads to an increase in the ratio of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine in host cells and a decrease in HCV replication [64], further strengthening the link between lipid metabolism and HCV replication. Moreover, a functional chemical compound screen identified the estrogen receptor alpha (ESR α) as an interaction partner of NS5B within lipid rafts on ER membranes [176]. Indeed, tamoxifen, a partial ESR agonist and prototype selective estrogen-receptor modulator, as well as a decoy peptide against ESR α -NS5B interaction inhibited HCV replication and ESR α -NS5B interaction in the replicase complex [176]. ESR α may thus also represent a potential target for anti-HCV therapy. Finally, it has been recently reported that HCV replication can also be inhibited by cholesterol-25-hydroxylase (CH25H) whose expression is increased upon HCV infection [177–179]. CH25H synthesizes 25-hydroxycholesterol (25HC) which displays antiviral activities against different enveloped viruses and may thus represent a broad-spectrum antiviral [163,180]. The anti-HCV activity of CH25H appears to be mediated through 25HC-dependent and independent events including the interaction with NS5A that prevents NS5A dimerization required for viral replication, the inhibition of the formation of the membranous web, and the disruption of the function of the transcription factors sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs), thereby perturbing the host lipid metabolism [177,179].

In addition to its role in HCV genome translation as described above, miR-122 is a hepatocyte-specific host factor essential for HCV replication. Indeed, HCV cannot replicate in cells lacking miR-122 or in which miR-122 has been sequestered [123,181–185]. The viral RNA contains two adjacent miR-122 sites in its 5' UTR and miR-122 binding to the HCV genome promotes viral replication [186,187]. MiR-122 thus represents an interesting target for antiviral therapy (reviewed in [188]) and the miR-122 inhibitor miravirsin has proven its efficacy in reducing viral loads in chronic hepatitis C patients in phase 1/2 clinical trials [28,29]. The antiviral activity of miravirsin may be due to two complementary mechanisms: the hybridizing to mature miR-122 that blocks its interaction with HCV RNA, and the binding to the stem-loop structure of pri- and pre-miR-122 that inhibits processing of miR-122 precursors [189].

Besides inhibiting host factors required for viral replication, HCV replication may also be inhibited by modulating host factors that restrict HCV replication, e.g., the elongation factor Tu GTP binding domain containing 2 (EFTUD2) and the human cytidine deaminase APOBEC3G (hA3G) [190–192]. Interestingly, hA3G stabilizers exhibit antiviral activity against HCV as hA3G binds to NS3, thereby inhibiting its helicase activity required for viral replication [190,193]. Given their original mechanism of action, this class of HTAs may deserve further research to optimize their activity.

Interestingly, compounds inhibiting histone deacetylase 6 (HDAC6) have also been reported to inhibit HCV replication [194,195]. The mechanism of action appears to involve hyperacetylation of α -tubulin [194]. Finally, a signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) inhibitor with anti-HCV effect has recently been uncovered in a high-throughput screen [135]. Indeed, STAT3 has been reported to be activated by HCV core and NS5A and to act as a proviral factor for HCV replication [196–198].

2.4. Assembly/Release Inhibitors to Prevent Generation and Release of New Virions

A remarkable hallmark of HCV is its association with VLDL/low density lipoprotein (LDL) to form an infectious lipoviroparticle (LVP) [199]. Intracellular assembly and egress of LVP depend on numerous factors involved in lipid metabolism (reviewed in [162,200]) and are closely linked to the VLDL production machinery [201]. Among the main factors involved in this process are lipid droplets (LDs), intracellular organelles that originate from triglyceride (TG) and cholesterol ester (CE) accumulation between the two leaflets of the ER bilayer [202]. This microenvironment

represents the “platform” for HCV particle assembly. Several host factors involved in TG biosynthesis and LD biogenesis have been demonstrated to contribute to this process and thus represent targets for HTAs (Figure 3). Indeed, HCV morphogenesis is triggered by the recruitment of the viral core protein from the ER to LDs [203], a process mediated by the diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT-1) (Figure 3). Interestingly, a DGAT-1 chemical inhibitor, currently in clinical trials for metabolic diseases (reviewed in [204]), might serve as an antiviral against HCV infection [205]. Notably, since in hepatocytes DGAT-2 has redundant functions in LD morphogenesis, this DGAT-1-specific inhibitor did not impair LD homeostasis *in vitro* [205]. The safety of DGAT-1 inhibitor LCQ908 has already been evaluated in HCV-infected patients (<https://clinicaltrials.gov/>; Identifier: NCT01387958), but additional studies are needed to assess its antiviral efficacy in patients.

Core recruitment to LDs also depends on the composition and the fluidity of ER lipid bilayers that is regulated by the cytosolic phospholipase A2, group 4A, (PLA2G4A) and upstream mitogen-activated protein kinases-extracellular signal regulated kinases (MAPK/ERK). PLA2G4A has been shown to contribute to HCV assembly since pyrrolidine-2 (Py-2), a chemical inhibitor of PLA2G4A, induces aberrant HCV particle production [206]. Furthermore, selective inhibitors of the MAPK/ERK pathway can block infectious HCV production [206,207]. However, opposite studies demonstrated that inhibition of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway enhances HCV translation/replication, and disturbs IFN signaling [208–210]. The potential of MAPK inhibitors as antivirals thus remains to be further investigated. The cytosolic phospholipase A2, group 4C, (PLA2G4C) is another enzyme involved in LD homeostasis that can be targeted by HTAs to inhibit assembly. Indeed, the “methyl arachidonyl fluorophosphonate” molecule (MAFP) significantly reduced HCV assembly by sequestering viral proteins to the ER prior to virion assembly [211].

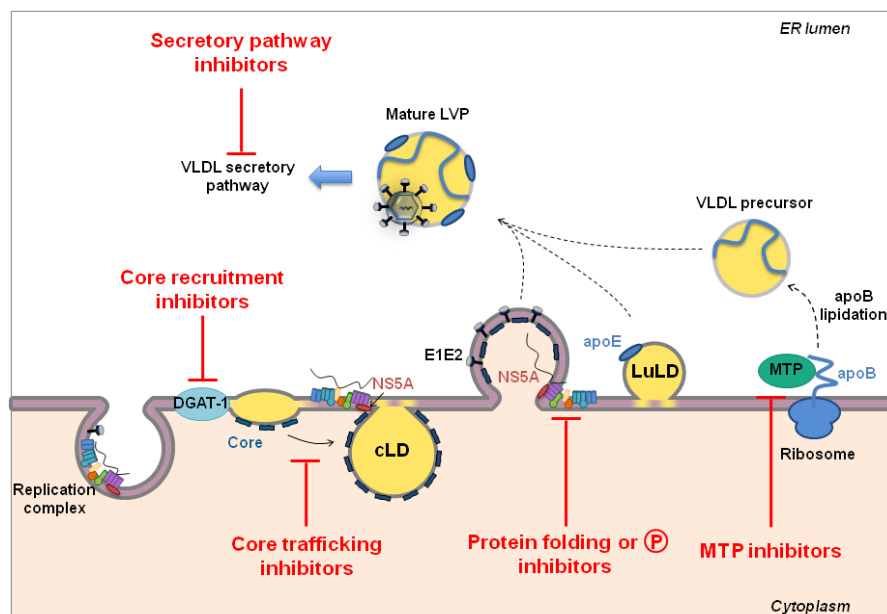


Figure 3. Schematic representation of HCV assembly. Virion assembly is triggered by core recruitment on cytosolic lipid droplets (cLDs) by the diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT-1). In turn, replication complexes are recruited through core-NS5A interactions. Nucleocapsid formation is mediated by viral budding into the ER lumen, at the site of VLDL production. The immature viral particles fuse or attach to a luminal LD (LuLD) through apoE-E1E2 and apoE-NS5A interactions. During VLDL synthesis, apolipoprotein B (apoB) is directly produced in the ER lumen and enriched in lipids by the microsomal triglyceride transfer protein (MTP) to generate VLDL precursors. Viral particles merge with these nascent VLDLs to generate mature lipoviroparticles (LVPs). LVPs enter the VLDL maturation and secretion pathway to be released from hepatocytes. HCV assembly and egress can be impaired by targeting different steps of these processes as highlighted in red.

Directly targeting core trafficking in hepatocytes also represents an interesting antiviral strategy given the numerous host factors involved in this process (Figure 3). These include AP2M1, the μ subunit of the clathrin adaptor protein complex 2 (AP-2) that interacts with the core protein through a process involving the adaptor-associated kinase 1 (AAK1) and the cyclin-associated kinase (GAK) [79,96,212]. Approved anticancer kinase inhibitors, such as erlotinib or dasatinib targeting GAK and sunitinib or PKC-412 targeting AAK1, can disrupt core-AP2M1 interaction and, thus, HCV assembly [79,96,213]. However, it has to be pointed out that these compounds were initially designed to target other kinases—some of which are involved in HCV entry (see Section 2.1 above)—and thus lack selectivity for GAK and AAK1. The recently reported GAK inhibitor isothiazolo[5,4-b]pyridine that displays limited off-target binding to other kinases efficiently inhibits HCV entry and assembly, and may thus be further developed as a potential antiviral [96].

Other HTAs interfering with host cell lipid metabolism have been reported to display antiviral activity against HCV. Indeed, resveratrol that increases the expression of PPAR α , a nuclear transcription factor that activates fatty acid oxidation and is decreased by the core protein [214,215], impairs HCV assembly and secretion by enhancing consumption of fatty acids [216]. Moreover, recent screens identified pterostilbene, a methylated form of resveratrol, toremifene, an estrogen receptor modulator similar to tamoxifen, and quinidine, an antiarrhythmic drug, as potential antivirals against HCV [11,12]. Naringenin was also shown to block production of infectious HCV particles through the activation of PPAR α [36]. Interestingly, HCV can also repress PPAR α activity and lipid accumulation by inducing up-regulation of miR-27b and bezafibrate, a PPAR α agonist, which reverses miR-27b-induced lipid accumulation [217]. This indicates the potential of additional strategies to design novel HTAs against HCV.

Besides core, NS5A is another major player within the HCV replication cycle that connects replication and assembly. NS5A-core interaction on LDs is a crucial step for viral assembly [203,218–220]. Assembly competence of NS5A is mediated by the Casein Kinase (CK)-mediated phosphorylation of multiple serine and threonine residues [221,222]. Indeed, the specific CKII inhibitor, 2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole (DMAT), was shown to dramatically disrupt virion biogenesis [221] (Figure 3). However, HCV genotype 1a virus production did not appear to be affected by DMAT [223]. Thus, genotype-specific differences might have to be taken into account for potential future clinical application of such inhibitors. To date, one chemical inhibitor of CKII, CX-4945, has entered clinical trials for its antitumor activity, but the potential antiviral effect against HCV remains to be determined [224].

HCV particle assembly and egress appear to share several host factors with VLDL assembly and secretion pathways [201,225] (Figure 3). The early step of VLDL synthesis consists of lipidation of the newly synthesized apolipoprotein B (apoB) across the ER membrane by the microsomal triglyceride transfer protein (MTP). In the second step, the VLDL precursors are enriched in lipids *via* fusion with resident apoE containing LDs (for a review, see [226]). Accumulating evidence demonstrates the crucial role of apoE in HCV assembly [62,63,227–231], while the role of apoB and MTP still remains unclear and controversial [62,63,201,225,232]. Nevertheless, a recent study demonstrated the ability of amiodarone, a cationic amphipathic drug that inhibits MTP activity, to down-regulate HCV assembly and release in cell culture [233] (Figure 3). Several other MTP inhibitors are in clinical trials for the treatment of hyperlipidemia (reviewed in [234]). However, whether amiodarone and other MTP inhibitors display an antiviral effect against HCV *in vivo* remains to be determined.

The VLDL secretory pathway is also hijacked to facilitate HCV egress from infected hepatocytes [201,225] (Figure 3). VLDL secretion is regulated by the hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α), the most abundant transcription factor in the liver. Interestingly, HNF4 α also regulates expression of phospholipase A2 GXIIB (PLA2GXIIB), a crucial host factor for HCV production [235]. HNF4 α down-regulation by bezafibrate dramatically reduced HCV secretion [235]. In line with this study, a meta-analysis showed that bezafibrate is associated with a reduction of viral load in chronically HCV-infected patients [168]. Moreover, in association with IFN and ribavirin, bezafibrate

has been reported to reduce serum HCV RNA titers and to improve liver dysfunction [37]. Cyps have also been reported to contribute to HCV virion secretion in addition to their role in viral replication [150]. The Cyp inhibitor NIM811 alters lipid trafficking and decreases apoB secretion through the VLDL pathway, thereby blocking HCV production [236]. The combination of NIM811 with PEG-IFN α showed significant antiviral activity compared to IFN alone in chronically infected HCV patients [34]. This synergistic effect may be due to the inhibition of both HCV replication and assembly by NIM811.

To counteract HCV proliferation, several studies reported a novel antiviral strategy that uses the human heat shock cognate protein 70 (Hsc70) as an antiviral target [237–240]. Hsc70 was identified as a part of the viral particle that modulates virion capsid assembly and LD-dependent virus release [241]. IMB-DM122 [237] and N-substituted benzyl matrinic acid [239] inhibit Hsc70 expression through destabilization of Hsc70 mRNA. Treatment of HCV-infected hepatocytes with these components reduced the incorporation of Hsc70 into viral nucleocapsids, and therefore disrupted HCV production. Moreover, both compounds demonstrated good oral pharmacokinetic profiles and high safety *in vivo*, making these molecules promising candidates for clinical trials [237,239]. Recently, it has been reported that (+)-lycoridine exhibits anti-HCV activity through its inhibitory effect on the expression of Hsc70 [238]. However, the significant cytotoxicity of this compound precluded further development and new phenanthridines with reduced toxicity have been designed [240]. Their potential as antivirals remains to be determined.

Finally, a promising strategy developed to inhibit virion assembly is to interfere with glucosidases that ensure N-glycosylation and folding of HCV envelope glycoproteins E1 and E2 [242] (Figure 3). It was shown that celgosivir, an α -glucosidase I inhibitor, leads to reduced viral production and infectivity *in vitro*. Moreover, celgosivir administration in combination with PEG-IFN α and ribavirin displayed a clinical benefit in genotype 1 chronically infected patients (reviewed in [35]). Long-term studies are needed to confirm its safety in humans.

3. HTAs to Prevent HCV Resistance

Given that they target a highly variable virus, the main limitation of DAAs is viral resistance. Viral resistance may be prevented using different strategies including (i) targeting conserved viral sequences less prone to mutation; (ii) using a combination of drugs exhibiting distinct targets and mechanisms of action; and (iii) increasing host antiviral responses. In contrast to the first DAAs, the emergence of viral resistance with recently approved DAAs, such as sofosbuvir, is less frequent but has nevertheless been described [2,243–245]. Given the generally lower barrier to resistance of DAAs as compared to HTAs, the emergence of treatment-resistant viral variants during DAA therapy remains a challenge. By acting through a complementary mechanism of action and by exhibiting a generally higher barrier to resistance, HTAs can be associated with DAAs to prevent viral resistance. Indeed, given their complementary mechanism of action, HTAs and DAAs can act in a synergistic manner to reduce viral loads [13,21,103] (Figure 4). Interestingly, various HTAs may also be combined to synergistically inhibit HCV infection, as demonstrated for combinations of a HTEI and host-targeting replication inhibitor, *i.e.*, a Cyp inhibitor [21]. Furthermore, HTEIs have been demonstrated to prolong viral suppression by DAAs and to prevent viral dissemination of DAA-resistant strains *in vitro* [21,246,247]. Indeed, although treatment of HCV-infected cells with DAAs rapidly results in a dramatic reduction of viral load *in vitro*, viral rebound is usually observed following withdrawal of the drug. However, the addition of an HTEI to the cell culture at the time of DAA withdrawal allows the further decrease of the viral load, indicating that HTEIs limit viral rebound from DAA therapy [21,246]. Furthermore, as many HTEIs inhibit cell-to-cell transmission that has been shown to represent the major route of transmission of wild type and DAA-resistant viruses, HTEIs have been demonstrated to limit dissemination of DAA-resistant strains and consequently prevent antiviral resistance [247]. In line with these *in vitro* data, the Cyp inhibitor alisporivir, currently in phase 2/3 clinical trials, has been shown to efficiently reduce

viral loads in chronic hepatitis C patients in combination with ribavirin [32] and future clinical trials evaluating its antiviral effect in combination with DAAs will provide further insights into the potential of this HTA.

Thus far, no viral resistance to HTAs was observed in preclinical or clinical studies [24,28,248]. However, some resistant viral variants could be selected by viral passaging *in vitro* [75,103]. This has been first evidenced and most extensively studied with Cyp inhibitors [249–252]. Of note, it was difficult to generate variants exhibiting Cyp inhibitor resistance and the time required to select resistance against these HTAs was significantly longer as compared to DAAs; furthermore, the resistance level was lower [249,250]. These data suggested that these viral variants were less dependent on CypA-dependent isomerization of NS5A for their replication [250]. Moreover, while prolonged administration of miravirsin (a miR-122 inhibitor) did not result in the emergence of viral variants exhibiting mutations within the miR-122 binding regions in preclinical and clinical trials [28,248], viral variants exhibiting a single nucleotide change in the 5'UTR between the miR-122 binding sites and requiring less miR-122 for their replication could be identified *in vitro* [253]. Whether the emergence of such variants could be avoided by combining miravirsin with other HTAs and/or DAAs with anti-HCV activity remains to be determined. Collectively, these studies indicate that HCV may become less dependent on defined host factors under selection pressure *in vitro*. While most mutants were still dependent on Cyp and/or miR-122, specific mutations in NS5A eliminated the dependence of HCV RNA replication on the expression of host CypA [152]. Notably, a recent study reported that HCV is able to change its host factor dependency under selection pressure. Indeed, in CLDN1 knock-out cells, a CLDN1-dependent strain was able to evolve to use CLDN6 or CLDN9 as a receptor [75]. Whether this may occur *in vivo* where CLDN1 is expressed at much higher levels than CLDN6 and CLDN9 remains to be determined (reviewed in [254]).

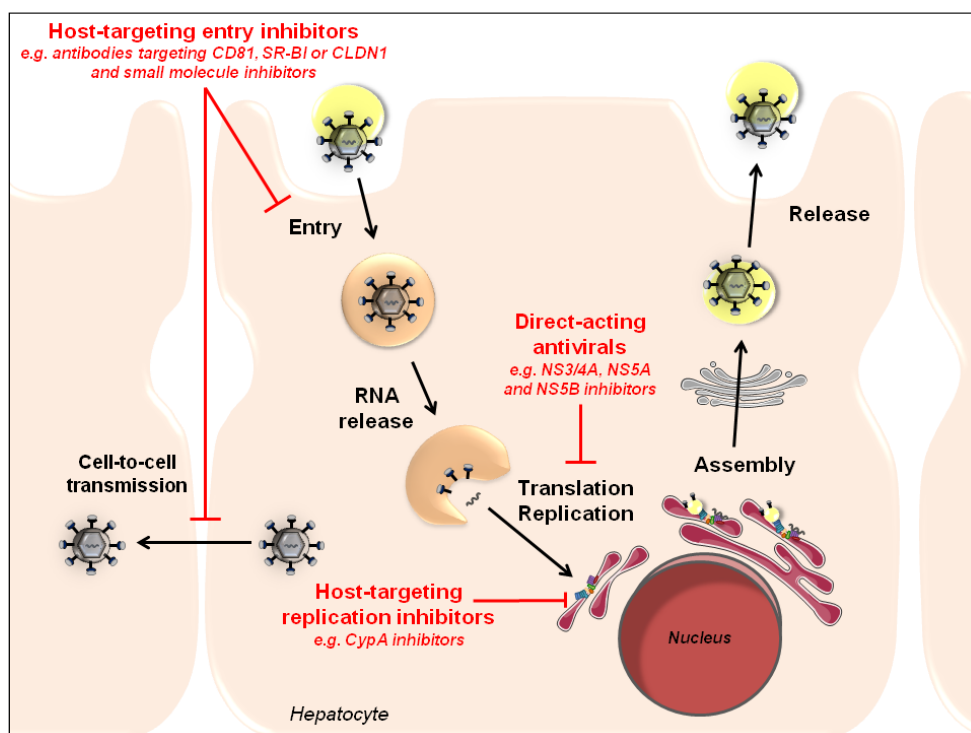


Figure 4. Synergy between HTAs and DAAs to inhibit HCV infection at different steps of the viral life cycle. Given their complementary mechanism of action, HTAs and DAAs can act in a synergistic manner to reduce viral loads and to prevent viral resistance. Different classes of HTAs and DAAs that have been evaluated in combination are highlighted in red.

4. Conclusions and Perspectives

During the last decade, the development of new DAAs considerably improved anti-HCV therapy, displaying high cure rates in treated patients. However, treatment failure and resistance in a subset of patients remain a challenge. Alternative approaches targeting host factors involved in HCV pathogenesis offer new treatment opportunities. Due to low genetic variability of host factors, HTAs exhibit a high genetic barrier to resistance and display a pan-genotypic antiviral activity.

Several HTAs are currently in development in preclinical or clinical trials (Table 1). Proof-of-concept studies on alisporivir and miravirsen have already shown very high cure rates in phase 2 and 3 clinical trials when used in monotherapy. Preclinical studies have also demonstrated the potential synergistic activity of HTA/DAA combinations to cure HCV infection (Figure 4). Synergy between DAAs and HTAs offers a prospective option for combination therapies for treatment failure to licensed therapies. Furthermore, entry inhibitors, such as anti-receptor antibodies, could offer prevention for HCV graft infection during LT. Indeed, it has been shown that such inhibitors impair cell infection of highly variable quasispecies isolated from individual patients as well as escape variants resistant to host neutralizing antibodies [25,77,78,81–96]. However, their clinical efficacy remains to be demonstrated. To conclude, HTAs may widen the therapeutic arsenal against chronic HCV infection and simplify HCV therapy.

Acknowledgments: The author's work is supported by Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale), University of Strasbourg, the European Union (INTERREG-IV-Rhin Supérieur-FEDER-Hepato-Regio-Net 2012, FP7 HepaMab and Infect-Era hepBccc), ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales, 2012/239, 2013/108), Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, Paris, Institut Hospitalo-Universitaire, Strasbourg (TheraHCC IHUARC IHU201301187) and the Initiative of Excellence (IdEx) Program from the University of Strasbourg This work has been published under the framework of the Laboratory of excellence (LABEX) ANR-10-LABX-0028_HEPSYS and benefits from a funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the Investments for the future program. E.C. is supported by a fellowship of the French Ministry for Research and Higher Education (MESR).

Author Contributions: M.B.Z and E.C. did the literature search and wrote the manuscript. M.B.Z., T.F.B. and C.S. edited the manuscript. M.B.Z. and E.C. designed illustrations.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. Inserm, the University of Strasbourg and Aldevron/Genovac have filed patent applications on monoclonal antibodies targeting host factors and inhibiting HCV infection and kinases as antiviral targets.

References

1. Lindenbach, B.D.; Thiel, H.J.; Rice, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott-Raven: Philadelphia, PA, USA, 2007; pp. 1101–1152.
2. Chung, R.T.; Baumert, T.F. Curing chronic hepatitis C—The arc of a medical triumph. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 1576–1578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Steinmann, E.; Pietschmann, T. Cell culture systems for hepatitis C virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *369*, 17–48. [[PubMed](#)]
4. Billerbeck, E.; de Jong, Y.; Dorner, M.; de la Fuente, C.; Ploss, A. Animal models for hepatitis C. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *369*, 49–86. [[PubMed](#)]
5. Mailly, L.; Robinet, E.; Meuleman, P.; Baumert, T.F.; Zeisel, M.B. Hepatitis C virus infection and related liver disease: The quest for the best animal model. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Zeisel, M.B.; Felmlee, D.J.; Baumert, T.F. Hepatitis C virus entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *369*, 87–112. [[PubMed](#)]
7. Niepmann, M. Hepatitis C virus RNA translation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *369*, 143–166. [[PubMed](#)]
8. Lohmann, V. Hepatitis C virus RNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *369*, 167–198. [[PubMed](#)]
9. Lindenbach, B.D. Virion assembly and release. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *369*, 199–218. [[PubMed](#)]
10. Baugh, J.M.; Garcia-Rivera, J.A.; Galloway, P.A. Host-targeting agents in the treatment of hepatitis C: A beginning and an end? *Antivir. Res.* **2013**, *100*, 555–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Gastaminza, P.; Whitten-Bauer, C.; Chisari, F.V. Unbiased probing of the entire hepatitis C virus life cycle identifies clinical compounds that target multiple aspects of the infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 291–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Chockalingam, K.; Simeon, R.L.; Rice, C.M.; Chen, Z. A cell protection screen reveals potent inhibitors of multiple stages of the hepatitis C virus life cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 3764–3769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. He, S.; Lin, B.; Chu, V.; Hu, Z.; Hu, X.; Xiao, J.; Wang, A.Q.; Schweitzer, C.J.; Li, Q.; Imamura, M.; *et al.* Repurposing of the antihistamine chlorcyclizine and related compounds for treatment of hepatitis C virus infection. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Libri, N.A.; Barker, S.J.; Rosenberg, W.M.; Semper, A.E. A class C CpG toll-like receptor 9 agonist successfully induces robust interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells from patients chronically infected with hepatitis C. *J. Viral Hepat.* **2009**, *16*, 315–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bergmann, J.F.; de Bruijne, J.; Hotho, D.M.; de Knecht, R.J.; Boonstra, A.; Weegink, C.J.; van Vliet, A.A.; van de Wetering, J.; Fletcher, S.P.; Bauman, L.A.; *et al.* Randomised clinical trial: Anti-viral activity of ANA773, an oral inducer of endogenous interferons acting via TLR7, in chronic HCV. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2011**, *34*, 443–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Boonstra, A.; Liu, B.S.; Groothuisink, Z.M.; Bergmann, J.F.; de Bruijne, J.; Hotho, D.M.; Hansen, B.E.; van Vliet, A.A.; van de Wetering de Rooij, J.; Fletcher, S.P.; *et al.* Potent immune activation in chronic hepatitis C patients upon administration of an oral inducer of endogenous interferons that acts via Toll-like receptor 7. *Antivir. Ther.* **2012**, *17*, 657–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. McHutchison, J.G.; Bacon, B.R.; Gordon, S.C.; Lawitz, E.; Shiffman, M.; Afdhal, N.H.; Jacobson, I.M.; Muir, A.; Al-Adhami, M.; Morris, M.L.; *et al.* Phase 1B, randomized, double-blind, dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus. *Hepatology* **2007**, *46*, 1341–1349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Meuleman, P.; Hesselgesser, J.; Paulson, M.; vanwolleghem, T.; Desombere, I.; Reiser, H.; Leroux-Roels, G. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection *in vivo*. *Hepatology* **2008**, *48*, 1761–1768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Lacek, K.; Vercauteren, K.; Grzyb, K.; Naddeo, M.; Verhoye, L.; Slowikowski, M.P.; Fafi-Kremer, S.; Patel, A.H.; Baumert, T.F.; Folgori, A.; *et al.* Novel human SR-BI antibodies prevent infection and dissemination of HCV *in vitro* and in humanized mice. *J. Hepatol.* **2012**, *57*, 17–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Vercauteren, K.; van den Eede, N.; Mesalam, A.A.; Belouzard, S.; Catanese, M.T.; Bankwitz, D.; Wong-Staal, F.; Cortese, R.; Dubuisson, J.; Rice, C.M.; *et al.* Successful anti-scavenger receptor class B type I (SR-BI) monoclonal antibody therapy in humanized mice after challenge with HCV variants with *in vitro* resistance to SR-BI-targeting agents. *Hepatology* **2014**, *60*, 1508–1518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Xiao, F.; Fofana, I.; Thumann, C.; Mailly, L.; Alles, R.; Robinet, E.; Meyer, N.; Schaeffer, M.; Habersetzer, F.; Doffoel, M.; *et al.* Synergy of entry inhibitors with direct-acting antivirals uncovers novel combinations for prevention and treatment of hepatitis C. *Gut* **2015**, *64*, 483–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Masson, D.; Koseki, M.; Ishibashi, M.; Larson, C.J.; Miller, S.G.; King, B.D.; Tall, A.R. Increased HDL cholesterol and apoA-I in humans and mice treated with a novel SR-BI inhibitor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29*, 2054–2060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sulkowski, M.S.; Kang, M.; Matining, R.; Wyles, D.; Johnson, V.A.; Morse, G.D.; Amorosa, V.; Bhattacharya, D.; Coughlin, K.; Wong-Staal, F.; *et al.* Safety and antiviral activity of the HCV entry inhibitor ITX5061 in treatment-naive HCV-infected adults: A randomized, double-blind, phase 1b study. *J. Infect. Dis.* **2014**, *209*, 658–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mailly, L.; Xiao, F.; Lupberger, J.; Wilson, G.K.; Aubert, P.; Duong, F.H.; Calabrese, D.; Leboeuf, C.; Fofana, I.; Thumann, C.; *et al.* Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 549–554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sainz, B., Jr.; Barretto, N.; Martin, D.N.; Hiraga, N.; Imamura, M.; Hussain, S.; Marsh, K.A.; Yu, X.; Chayama, K.; Alrefai, W.A.; *et al.* Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 281–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Marino, Z.; Crespo, G.; D'Amato, M.; Brambilla, N.; Giacovelli, G.; Rovati, L.; Costa, J.; Navasa, M.; Forns, X. Intravenous silibinin monotherapy shows significant antiviral activity in HCV-infected patients in the peri-transplantation period. *J. Hepatol.* **2013**, *58*, 415–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Fried, M.W.; Navarro, V.J.; Afdhal, N.; Belle, S.H.; Wahed, A.S.; Hawke, R.L.; Doo, E.; Meyers, C.M.; Reddy, K.R. Effect of silymarin (milk thistle) on liver disease in patients with chronic hepatitis C unsuccessfully treated with interferon therapy: A randomized controlled trial. *JAMA* **2012**, *308*, 274–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Janssen, H.L.; Kauppinen, S.; Hodges, M.R. HCV infection and miravirsen. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 877–878.
29. Van der Ree, M.H.; van der Meer, A.J.; de Bruijne, J.; Maan, R.; van Vliet, A.; Welzel, T.M.; Zeuzem, S.; Lawitz, E.J.; Rodriguez-Torres, M.; Kupcova, V.; *et al.* Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients. *Antivir. Res.* **2014**, *111*, 53–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Harrison, S.A.; Rossaro, L.; Hu, K.Q.; Patel, K.; Tillmann, H.; Dhaliwal, S.; Torres, D.M.; Koury, K.; Goteti, V.S.; Noviello, S.; *et al.* Serum cholesterol and statin use predict virological response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatology* **2010**, *52*, 864–874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Rao, G.A.; Pandya, P.K. Statin therapy improves sustained virologic response among diabetic patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 144–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pawlotsky, J.M.; Flisiak, R.; Sarin, S.K.; Rasenack, J.; Piratvisuth, T.; Chuang, W.L.; Peng, C.Y.; Foster, G.R.; Shah, S.; Wedemeyer, H.; *et al.* Alisporivir plus ribavirin, interferon-free or in combination with peg-interferon, for HCV genotype 2 or 3 infection. *Hepatology* **2015**, *62*, 1013–1023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hopkins, S.; Dimassimo, B.; Rusnak, P.; Heuman, D.; Lalezari, J.; Sluder, A.; Scorneaux, B.; Mosier, S.; Kowalczyk, P.; Ribeill, Y.; *et al.* The cyclophilin inhibitor SCY-635 suppresses viral replication and induces endogenous interferons in patients with chronic HCV genotype 1 infection. *J. Hepatol.* **2012**, *57*, 47–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lawitz, E.; Godofsky, E.; Rouzier, R.; Marbury, T.; Nguyen, T.; Ke, J.; Huang, M.; Praetgaard, J.; Serra, D.; Evans, T.G. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of the cyclophilin inhibitor NIM811 alone or in combination with pegylated interferon in HCV-infected patients receiving 14 days of therapy. *Antivir. Res.* **2011**, *89*, 238–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Durantel, D. Celgosivir, an alpha-glucosidase I inhibitor for the potential treatment of HCV infection. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2009**, *10*, 860–870. [[PubMed](#)]
36. Goldwasser, J.; Cohen, P.Y.; Lin, W.; Kitsberg, D.; Balaguer, P.; Polyak, S.J.; Chung, R.T.; Yarmush, M.L.; Nahmias, Y. Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism. *J. Hepatol.* **2011**, *55*, 963–971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Fujita, N.; Kaito, M.; Kai, M.; Sugimoto, R.; Tanaka, H.; Horiike, S.; Konishi, M.; Iwasa, M.; Watanabe, S.; Adachi, Y. Effects of bezafibrate in patients with chronic hepatitis C virus infection: Combination with interferon and ribavirin. *J. Viral Hepat.* **2006**, *13*, 441–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ciancio, A.; Andreone, P.; Kaiser, S.; Mangia, A.; Milella, M.; Sola, R.; Pol, S.; Tsianos, E.; de Rosa, A.; Camerini, R.; *et al.* Thymosin alpha-1 with peginterferon alfa-2a/ribavirin for chronic hepatitis C not responsive to IFN/ribavirin: An adjuvant role? *J. Viral Hepat.* **2012**, *19* (Suppl. S1), 52–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Rossignol, J.F.; Elfert, A.; El-Gohary, Y.; Keeffe, E.B. Improved virologic response in chronic hepatitis C genotype 4 treated with nitazoxanide, peginterferon, and ribavirin. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 856–862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Shehab, H.M.; Elbaz, T.M.; Deraz, D.M. Nitazoxanide plus pegylated interferon and ribavirin in the treatment of genotype 4 chronic hepatitis C, a randomized controlled trial. *Liver Int.* **2014**, *34*, 259–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Barth, H.; Schäfer, C.; Adah, M.I.; Zhang, F.; Linhardt, R.J.; Toyoda, H.; Kinoshita-Toyoda, A.; Toida, T.; van Kuppevelt, T.H.; Depla, E.; *et al.* Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41003–41012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Barth, H.; Schnober, E.K.; Zhang, F.; Linhardt, R.J.; Depla, E.; Boson, B.; Cosset, F.L.; Patel, A.H.; Blum, H.E.; Baumert, T.F. Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J. Virol.* **2006**, *80*, 10579–10590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Haberstroh, A.; Schnober, E.K.; Zeisel, M.B.; Carolla, P.; Barth, H.; Blum, H.E.; Cosset, F.L.; Koutsoudakis, G.; Bartenschlager, R.; Union, A.; *et al.* Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 1719–1728.e1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Jiang, J.; Cun, W.; Wu, X.; Shi, Q.; Tang, H.; Luo, G. Hepatitis C Virus Attachment Mediated by Apolipoprotein E Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. *J. Virol.* **2012**, *86*, 7256–7267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Jiang, J.; Wu, X.; Tang, H.; Luo, G. Apolipoprotein E mediates attachment of clinical hepatitis C virus to hepatocytes by binding to cell surface heparan sulfate proteoglycan receptors. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Xu, Y.; Martinez, P.; Seron, K.; Luo, G.; Allain, F.; Dubuisson, J.; Belouzard, S. Characterization of hepatitis C virus interaction with heparan sulfate proteoglycans. *J. Virol.* **2015**, *89*, 3846–3858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Shi, Q.; Jiang, J.; Luo, G. Syndecan-1 Serves as the Major Receptor for Attachment of Hepatitis C Virus to the surface of hepatocytes. *J. Virol.* **2013**, *87*, 6866–6875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lefevre, M.; Felmlee, D.J.; Parnot, M.; Baumert, T.F.; Schuster, C. Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e95550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Monazahian, M.; Bohme, I.; Bonk, S.; Koch, A.; Scholz, C.; Grethe, S.; Thomssen, R. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* **1999**, *57*, 223–229. [[CrossRef](#)]
50. Agnello, V.; Abel, G.; Elfahal, M.; Knight, G.B.; Zhang, Q.X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12766–12771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Wunschmann, S.; Medh, J.D.; Klinzmann, D.; Schmidt, W.N.; Stapleton, J.T. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J. Virol.* **2000**, *74*, 10055–10062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Germi, R.; Crance, J.M.; Garin, D.; Guimet, J.; Lortat-Jacob, H.; Ruigrok, R.W.; Zarski, J.P.; Drouet, E. Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J. Med. Virol.* **2002**, *68*, 206–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Prentoe, J.; Serre, S.B.; Ramirez, S.; Nicosia, A.; Gottwein, J.M.; Bukh, J. 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.* **2014**, *88*, 1725–1739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Scarselli, E.; Ansuini, H.; Cerino, R.; Roccasecca, R.M.; Acali, S.; Filocamo, G.; Traboni, C.; Nicosia, A.; Cortese, R.; Vitelli, A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **2002**, *21*, 5017–5025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bartosch, B.; Vitelli, A.; Granier, C.; Goujon, C.; Dubuisson, J.; Pascale, S.; Scarselli, E.; Cortese, R.; Nicosia, A.; Cosset, F.L. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41624–41630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Barth, H.; Cerino, R.; Arcuri, M.; Hoffmann, M.; Schurmann, P.; Adah, M.I.; Gissler, B.; Zhao, X.; Ghisetti, V.; Lavezzo, B.; *et al.* Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *J. Virol.* **2005**, *79*, 5774–5785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Maillard, P.; Huby, T.; Andreo, U.; Moreau, M.; Chapman, J.; Budkowska, A. The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *Faseb J.* **2006**, *20*, 735–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Dreux, M.; Dao Thi, V.L.; Fresquet, J.; Guerin, M.; Julia, Z.; Verney, G.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Lavillette, D.; Cosset, F.L.; Bartosch, B. Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Dao Thi, V.L.; Granier, C.; Zeisel, M.B.; Guerin, M.; Mancip, J.; Granio, O.; Penin, F.; Lavillette, D.; Bartenschlager, R.; Baumert, T.F.; *et al.* Characterization of Hepatitis C Virus Particle Subpopulations Reveals Multiple Usage of the Scavenger Receptor BI for Entry Steps. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 31242–31257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Lindenbach, B.D.; Rice, C.M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 688–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Krepstakies, M.; Lucifora, J.; Nagel, C.H.; Zeisel, M.B.; Holstermann, B.; Hohenberg, H.; Kowalski, I.; Gutschmann, T.; Baumert, T.F.; Brandenburg, K.; *et al.* A new class of synthetic peptide inhibitors blocks

- attachment and entry of human pathogenic viruses. *J. Infect. Dis.* **2012**, *205*, 1654–1664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Chang, K.S.; Jiang, J.; Cai, Z.; Luo, G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J. Virol.* **2007**, *81*, 13783–13793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Jiang, J.; Luo, G. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J. Virol.* **2009**, *83*, 12680–12691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Albecka, A.; Belouzard, S.; de Beeck, A.O.; Descamps, V.; Goueslain, L.; Bertrand-Michel, J.; Terce, F.; Duverlie, G.; Rouille, Y.; Dubuisson, J. Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* **2012**, *55*, 998–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Matsuhisa, K.; Yamane, S.; Okamoto, T.; Watari, A.; Kondoh, M.; Matsuura, Y.; Yagi, K. Anti-HCV effect of Lentinula edodes mycelia solid culture extracts and low-molecular-weight lignin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *462*, 52–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Raghuraman, A.; Tiwari, V.; Zhao, Q.; Shukla, D.; Debnath, A.K.; Desai, U.R. Viral inhibition studies on sulfated lignin, a chemically modified biopolymer and a potential mimic of heparan sulfate. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1759–1763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Andreo, U.; Maillard, P.; Kalinina, O.; Walic, M.; Meurs, E.; Martinot, M.; Marcellin, P.; Budkowska, A. Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9*, 2445–2456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Owen, D.M.; Huang, H.; Ye, J.; Gale, M., Jr. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* **2009**, *394*, 99–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Maillard, P.; Walic, M.; Meuleman, P.; Roohvand, F.; Huby, T.; le Goff, W.; Leroux-Roels, G.; Pecheur, E.I.; Budkowska, A. Lipoprotein lipase inhibits hepatitis C virus (HCV) infection by blocking virus cell entry. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Tao, J.; Kang, K.D.; Hall, S.D.; Laube, A.H.; Liu, J.; Renfrow, M.B.; Novak, J.; Luo, G. The Serum Very-Low-Density Lipoprotein Serves as a Restriction Factor against Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* **2015**, *89*, 6782–6791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Pileri, P.; Uematsu, Y.; Campagnoli, S.; Galli, G.; Falugi, F.; Petracca, R.; Weiner, A.J.; Houghton, M.; Rosa, D.; Grandi, G.; *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **1998**, *282*, 938–941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Sourisseau, M.; Michta, M.L.; Zony, C.; Israelow, B.; Hopcraft, S.E.; Narbus, C.M.; Parra Martin, A.; Evans, M.J. Temporal analysis of hepatitis C virus cell entry with occludin directed blocking antibodies. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Douam, F.; Dao Thi, V.L.; Maurin, G.; Fresquet, J.; Mompelat, D.; Zeisel, M.B.; Baumert, T.F.; Cosset, F.L.; Lavillette, D. Critical interaction between E1 and E2 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell entry. *Hepatology* **2014**, *59*, 776–788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Ren, Q.; Li, C.; Yuan, P.; Cai, C.; Zhang, L.; Luo, G.G.; Wei, W. A Dual-reporter system for real-time monitoring and high-throughput CRISPR/Cas9 library screening of the hepatitis C virus. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Hopcraft, S.E.; Evans, M.J. Selection of a hepatitis C virus with altered entry factor requirements reveals a genetic interaction between the E1 glycoprotein and claudins. *Hepatology* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Park, J.H.; Park, S.; Yang, J.S.; Kwon, O.S.; Kim, S.; Jang, S.K. Discovery of cellular proteins required for the early steps of HCV infection using integrative genomics. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Lupberger, J.; Zeisel, M.B.; Xiao, F.; Thumann, C.; Fofana, I.; Zona, L.; Davis, C.; Mee, C.J.; Turek, M.; Gorke, S.; *et al.* EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 589–595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Martin, D.N.; Uprichard, S.L. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 10777–10782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Neveu, G.; Ziv-Av, A.; Barouch-Bentov, R.; Berkerman, E.; Mulholland, J.; Einav, S. AP-2-associated protein kinase 1 and cyclin G-associated kinase regulate hepatitis C virus entry and are potential drug targets. *J. Virol.* **2015**, *89*, 4387–4404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Zona, L.; Tawar, R.G.; Zeisel, M.B.; Xiao, F.; Schuster, C.; Lupberger, J.; Baumert, T.F. CD81-receptor associations—Impact for hepatitis C virus entry and antiviral therapies. *Viruses* **2014**, *6*, 875–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

81. VanCompernelle, S.E.; Wiznycia, A.V.; Rush, J.R.; Dhanasekaran, M.; Baures, P.W.; Todd, S.C. Small molecule inhibition of hepatitis C virus E2 binding to CD81. *Virology* **2003**, *314*, 371–380. [[CrossRef](#)]
82. Cai, L.; de Beer, M.C.; de Beer, F.C.; van der Westhuyzen, D.R. Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2954–2961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Koutsoudakis, G.; Kaul, A.; Steinmann, E.; Kallis, S.; Lohmann, V.; Pietschmann, T.; Bartenschlager, R. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J. Virol.* **2006**, *80*, 5308–5320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Lavie, M.; Voisset, C.; Vu-Dac, N.; Zurawski, V.; Duverlie, G.; Wychowski, C.; Dubuisson, J. Serum amyloid A has antiviral activity against hepatitis C virus by inhibiting virus entry in a cell culture system. *Hepatology* **2006**, *44*, 1626–1634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Zeisel, M.B.; Koutsoudakis, G.; Schnober, E.K.; Haberstroh, A.; Blum, H.E.; Cosset, F.L.; Wakita, T.; Jaeck, D.; Doffoel, M.; Royer, C.; *et al.* Scavenger receptor BI is a key host factor for Hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* **2007**, *46*, 1722–1731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Krieger, S.E.; Zeisel, M.B.; Davis, C.; Thumann, C.; Harris, H.J.; Schnober, E.K.; Mee, C.; Soulier, E.; Royer, C.; Lambotin, M.; *et al.* Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* **2010**, *51*, 1144–1157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Fofana, I.; Krieger, S.E.; Grunert, F.; Glaben, S.; Xiao, F.; Fafi-Kremer, S.; Soulier, E.; Royer, C.; Thumann, C.; Mee, C.J.; *et al.* Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* **2010**, *39*, 953–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Syder, A.J.; Lee, H.; Zeisel, M.B.; Grove, J.; Soulier, E.; Macdonald, J.; Chow, S.; Chang, J.; Baumert, T.F.; McKeating, J.A.; *et al.* Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *J. Hepatol.* **2011**, *54*, 48–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Mittapalli, G.K.; Jackson, A.; Zhao, F.; Lee, H.; Chow, S.; McKelvy, J.; Wong-Staal, F.; Macdonald, J.E. Discovery of highly potent small molecule Hepatitis C Virus entry inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6852–6855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Mittapalli, G.K.; Zhao, F.; Jackson, A.; Gao, H.; Lee, H.; Chow, S.; Kaur, M.P.; Nguyen, N.; Zamboni, R.; McKelvy, J.; *et al.* Discovery of ITX 4520: A highly potent orally bioavailable hepatitis C virus entry inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4955–4961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Si, Y.; Liu, S.; Liu, X.; Jacobs, J.L.; Cheng, M.; Niu, Y.; Jin, Q.; Wang, T.; Yang, W. A human claudin-1-derived peptide inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* **2012**, *56*, 507–515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Zahid, M.N.; Turek, M.; Xiao, F.; Thi, V.L.; Guerin, M.; Fofana, I.; Bachellier, P.; Thompson, J.; Delang, L.; Neyts, J.; *et al.* The postbinding activity of scavenger receptor class B type I mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination. *Hepatology* **2013**, *57*, 492–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Fofana, I.; Xiao, F.; Thumann, C.; Turek, M.; Zona, L.; Tawar, R.G.; Grunert, F.; Thompson, J.; Zeisel, M.B.; Baumert, T.F. A novel monoclonal anti-CD81 antibody produced by genetic immunization efficiently inhibits Hepatitis C virus cell-cell transmission. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e64221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Zona, L.; Lupberger, J.; Sidahmed-Adrar, N.; Thumann, C.; Harris, H.J.; Barnes, A.; Florentin, J.; Tawar, R.G.; Xiao, F.; Turek, M.; *et al.* HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* **2013**, *13*, 302–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Yamashita, M.; Iida, M.; Tada, M.; Shirasago, Y.; Fukasawa, M.; Nagase, S.; Watari, A.; Ishii-Watabe, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Discovery of anti-claudin-1 antibodies as candidate therapeutics against hepatitis C virus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, *353*, 112–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Kovackova, S.; Chang, L.; Bekerman, E.; Neveu, G.; Barouch-Bentov, R.; Chaikuad, A.; Heroven, C.; Sala, M.; de Jonghe, S.; Knapp, S.; *et al.* Selective Inhibitors of Cyclin G Associated Kinase (GAK) as Anti-Hepatitis C Agents. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3393–3410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Meyer, K.; Kwon, Y.C.; Liu, S.; Hagedorn, C.H.; Ray, R.B.; Ray, R. Interferon-alpha inducible protein 6 impairs EGFR activation by CD81 and inhibits hepatitis C virus infection. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Blanchard, E.; Belouzard, S.; Goueslain, L.; Wakita, T.; Dubuisson, J.; Wychowski, C.; Rouille, Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **2006**, *80*, 6964–6972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

99. Matsumura, T.; Hu, Z.; Kato, T.; Dreux, M.; Zhang, Y.Y.; Imamura, M.; Hiraga, N.; Juteau, J.M.; Cosset, F.L.; Chayama, K.; *et al.* Amphipathic DNA polymers inhibit hepatitis C virus infection by blocking viral entry. *Gastroenterology* **2009**, *137*, 673–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Wagoner, J.; Negash, A.; Kane, O.J.; Martinez, L.E.; Nahmias, Y.; Bourne, N.; Owen, D.M.; Grove, J.; Brimacombe, C.; McKeating, J.A.; *et al.* Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology* **2010**, *51*, 1912–1921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Blaising, J.; Levy, P.L.; Polyak, S.J.; Stanifer, M.; Boulant, S.; Pecheur, E.I. Arbidol inhibits viral entry by interfering with clathrin-dependent trafficking. *Antivir. Res.* **2013**, *100*, 215–219. [[CrossRef](#)]
102. Blaising, J.; Levy, P.L.; Gondeau, C.; Phelip, C.; Varbanov, M.; Teissier, E.; Ruggiero, F.; Polyak, S.J.; Oberlies, N.H.; Ivanovic, T.; *et al.* Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking. *Cell. Microbiol.* **2013**, *15*, 1866–1882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Vausselin, T.; Calland, N.; Belouzard, S.; Descamps, V.; Douam, F.; Helle, F.; Francois, C.; Lavillette, D.; Duverlie, G.; Wahid, A.; *et al.* The antimalarial ferroquine is an inhibitor of hepatitis C virus. *Hepatology* **2013**, *58*, 86–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Ahmed-Belkacem, A.; Ahnou, N.; Barbotte, L.; Wychowski, C.; Pallier, C.; Brillet, R.; Pohl, R.T.; Pawlotsky, J.M. Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Gastroenterology* **2010**, *138*, 1112–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Mizui, T.; Yamashina, S.; Tanida, I.; Takei, Y.; Ueno, T.; Sakamoto, N.; Ikejima, K.; Kitamura, T.; Enomoto, N.; Sakai, T.; *et al.* Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J. Gastroenterol.* **2010**, *45*, 195–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Timpe, J.M.; Stamataki, Z.; Jennings, A.; Hu, K.; Farquhar, M.J.; Harris, H.J.; Schwarz, A.; Desombere, I.; Roels, G.L.; Balfe, P.; *et al.* Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* **2008**, *47*, 17–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Brimacombe, C.L.; Grove, J.; Meredith, L.W.; Hu, K.; Syder, A.J.; Flores, M.V.; Timpe, J.M.; Krieger, S.E.; Baumert, T.F.; Tellinghuisen, T.L.; *et al.* Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J. Virol.* **2011**, *85*, 596–605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Witteveldt, J.; Evans, M.J.; Bitzegeio, J.; Koutsoudakis, G.; Owsianka, A.M.; Angus, A.G.; Keck, Z.Y.; Fong, S.K.; Pietschmann, T.; Rice, C.M.; *et al.* CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 48–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Catanese, M.T.; Loureiro, J.; Jones, C.T.; Dorner, M.; von Hahn, T.; Rice, C.M. Different requirements for scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus cell-free versus cell-to-cell transmission. *J. Virol.* **2013**, *87*, 8282–8293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Meuleman, P.; Catanese, M.T.; Verhoye, L.; Desombere, I.; Farhoudi, A.; Jones, C.T.; Sheahan, T.; Grzyb, K.; Cortese, R.; Rice, C.M.; *et al.* 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* **2012**, *55*, 364–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Fukasawa, M.; Nagase, S.; Shirasago, Y.; Iida, M.; Yamashita, M.; Endo, K.; Yagi, K.; Suzuki, T.; Wakita, T.; Hanada, K.; *et al.* Monoclonal antibodies against extracellular domains of claudin-1 block hepatitis C virus infection in a mouse model. *J. Virol.* **2015**, *89*, 4866–4879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Neumann, U.P.; Biermer, M.; Eurich, D.; Neuhaus, P.; Berg, T. Successful prevention of hepatitis C virus (HCV) liver graft reinfection by silibinin mono-therapy. *J. Hepatol.* **2010**, *52*, 951–952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Payer, B.A.; Reiberger, T.; Rutter, K.; Beinhardt, S.; Staettermayer, A.F.; Peck-Radosavljevic, M.; Ferenci, P. Successful HCV eradication and inhibition of HIV replication by intravenous silibinin in an HIV-HCV coinfecting patient. *J. Clin. Virol.* **2010**, *49*, 131–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Aghemo, A.; Bhoori, S.; de Nicola, S.; Mazzaferro, V.; Colombo, M. Failure of Intravenous Silibinin Monotherapy to Prevent Hepatitis C Genotype 2A Liver Graft Reinfection. *Hepat. Mon.* **2012**, *12*, 411–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Barcena, R.; Moreno, A.; Rodriguez-Gandia, M.A.; Albillos, A.; Arocena, C.; Blesa, C.; Garcia-Hoz, F.; Graus, J.; Nuno, J.; Lopez-Hervas, P.; *et al.* Safety and anti-HCV effect of prolonged intravenous silibinin in HCV genotype 1 subjects in the immediate liver transplant period. *J. Hepatol.* **2013**, *58*, 421–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Tsukiyama-Kohara, K.; Iizuka, N.; Kohara, M.; Nomoto, A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* **1992**, *66*, 1476–1483. [[PubMed](#)]

117. Wang, C.; Sarnow, P.; Siddiqui, A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J. Virol.* **1993**, *67*, 3338–3344. [[PubMed](#)]
118. Pestova, T.V.; Shatsky, I.N.; Fletcher, S.P.; Jackson, R.J.; Hellen, C.U. 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.* **1998**, *12*, 67–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Kieft, J.S.; Zhou, K.; Jubin, R.; Doudna, J.A. Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* **2001**, *7*, 194–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Fontanes, V.; Raychaudhuri, S.; Dasgupta, A. A cell-permeable peptide inhibits hepatitis C virus replication by sequestering IRES transacting factors. *Virology* **2009**, *394*, 82–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Bhat, P.; Gnanasundram, S.V.; Mani, P.; Ray, P.S.; Sarkar, D.P.; Das, S. Targeting ribosome assembly on the HCV RNA using a small RNA molecule. *RNA Biol.* **2012**, *9*, 1110–1119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Tsukimoto, A.; Sugiyama, R.; Abe, M.; Nishitsuji, H.; Shimizu, Y.; Shimotohno, K.; Kawai, G.; Takaku, H. A new role for PGA1 in inhibiting hepatitis C virus-IRES-mediated translation by targeting viral translation factors. *Antivir. Res.* **2015**, *117*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Jopling, C.L.; Yi, M.; Lancaster, A.M.; Lemon, S.M.; Sarnow, P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **2005**, *309*, 1577–1581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Henke, J.I.; Goergen, D.; Zheng, J.; Song, Y.; Schuttler, C.G.; Fehr, C.; Junemann, C.; Niepmann, M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* **2008**, *27*, 3300–3310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Sengupta, J.; Nilsson, J.; Gursky, R.; Spahn, C.M.; Nissen, P.; Frank, J. Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 957–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Coyle, S.M.; Gilbert, W.V.; Doudna, J.A. Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 1626–1634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Majzoub, K.; Hafirassou, M.L.; Meignin, C.; Goto, A.; Marzi, S.; Fedorova, A.; Verdier, Y.; Vinh, J.; Hoffmann, J.A.; Martin, F.; *et al.* RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell* **2014**, *159*, 1086–1095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Watashi, K.; Ishii, N.; Hijikata, M.; Inoue, D.; Murata, T.; Miyanari, Y.; Shimotohno, K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol. Cell* **2005**, *19*, 111–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Randall, G.; Panis, M.; Cooper, J.D.; Tellinghuisen, T.L.; Sukhodolets, K.E.; Pfeffer, S.; Landthaler, M.; Landgraf, P.; Kan, S.; Lindenbach, B.D.; *et al.* Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12884–12889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Ng, T.I.; Mo, H.; Pilot-Matias, T.; He, Y.; Koev, G.; Krishnan, P.; Mondal, R.; Pithawalla, R.; He, W.; Dekhtyar, T.; *et al.* Identification of host genes involved in hepatitis C virus replication by small interfering RNA technology. *Hepatology* **2007**, *45*, 1413–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Supekova, L.; Supek, F.; Lee, J.; Chen, S.; Gray, N.; Pezacki, J.P.; Schlapbach, A.; Schultz, P.G. Identification of human kinases involved in hepatitis C virus replication by small interference RNA library screening. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Berger, K.L.; Cooper, J.D.; Heaton, N.S.; Yoon, R.; Oakland, T.E.; Jordan, T.X.; Mateu, G.; Grakoui, A.; Randall, G. Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 7577–7582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Tai, A.W.; Benita, Y.; Peng, L.F.; Kim, S.S.; Sakamoto, N.; Xavier, R.J.; Chung, R.T. A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* **2009**, *5*, 298–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Vaillancourt, F.H.; Pilote, L.; Cartier, M.; Lippens, J.; Liuzzi, M.; Bethell, R.C.; Cordingley, M.G.; Kukolj, G. Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* **2009**, *387*, 5–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Niu, Y.; Si, Y.; Li, Y.; Chi, X.; Li, X.; Liu, X.; Li, D.; Cheng, M.; Fan, J.; Si, S.; Yang, W. A novel small-molecule inhibitor of hepatitis C virus replication acts by suppressing signal transducer and activator of transcription 3. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 2013–2023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Egger, D.; Wolk, B.; Gosert, R.; Bianchi, L.; Blum, H.E.; Moradpour, D.; Bienz, K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* **2002**, *76*, 5974–5984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

137. Gouttenoire, J.; Roingeard, P.; Penin, F.; Moradpour, D. Amphipathic alpha-helix AH2 is a major determinant for the oligomerization of hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *J. Virol.* **2010**, *84*, 12529–12537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Paul, D.; Romero-Brey, I.; Gouttenoire, J.; Stoitsova, S.; Krijnse-Locker, J.; Moradpour, D.; Bartenschlager, R. NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. *J. Virol.* **2011**, *85*, 6963–6976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Romero-Brey, I.; Merz, A.; Chiramel, A.; Lee, J.Y.; Chlanda, P.; Haselman, U.; Santarella-Mellwig, R.; Habermann, A.; Hoppe, S.; Kallis, S.; *et al.* Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1003056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Ferraris, P.; Blanchard, E.; Roingeard, P. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91*, 2230–2237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Dreux, M.; Chisari, F.V. Impact of the autophagy machinery on hepatitis C virus infection. *Viruses* **2011**, *3*, 1342–1357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Wang, L.; James Ou, J.H. Hepatitis C virus and autophagy. *Biol. Chem.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Sir, D.; Kuo, C.F.; Tian, Y.; Liu, H.M.; Huang, E.J.; Jung, J.U.; Machida, K.; Ou, J.H. Replication of hepatitis C virus RNA on autophagosomal membranes. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 18036–18043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Paul, D.; Madan, V.; Bartenschlager, R. Hepatitis C virus RNA replication and assembly: Living on the fat of the land. *Cell Host Microbe* **2014**, *16*, 569–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Madan, V.; Paul, D.; Lohmann, V.; Bartenschlager, R. Inhibition of HCV replication by cyclophilin antagonists is linked to replication fitness and occurs by inhibition of membranous web formation. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1361–1372.e9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Chao, T.C.; Su, W.C.; Huang, J.Y.; Chen, Y.C.; Jeng, K.S.; Wang, H.D.; Lai, M.M. Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 (PSTPIP2), a host membrane-deforming protein, is critical for membranous web formation in hepatitis C virus replication. *J. Virol.* **2012**, *86*, 1739–1749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Dorner, M.; Horwitz, J.A.; Donovan, B.M.; Labitt, R.N.; Budell, W.C.; Friling, T.; Vogt, A.; Catanese, M.T.; Satoh, T.; Kawai, T.; *et al.* Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature* **2013**, *501*, 237–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Hanouille, X.; Badillo, A.; Wieruszkeski, J.M.; Verdegem, D.; Landrieu, I.; Bartenschlager, R.; Penin, F.; Lippens, G. Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilins A and B. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13589–13601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Kaul, A.; Stauffer, S.; Berger, C.; Pertel, T.; Schmitt, J.; Kallis, S.; Zayas, M.; Lohmann, V.; Luban, J.; Bartenschlager, R. Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Gaither, L.A.; Borawski, J.; Anderson, L.J.; Balabanis, K.A.; Devay, P.; Joberty, G.; Rau, C.; Schirle, M.; Bouwmeester, T.; Mickanin, C.; *et al.* Multiple cyclophilins involved in different cellular pathways mediate HCV replication. *Virology* **2010**, *397*, 43–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Naoumov, N.V. Cyclophilin inhibition as potential therapy for liver diseases. *J. Hepatol.* **2014**, *61*, 1166–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Hopkins, S.; Bobardt, M.; Chatterji, U.; Garcia-Rivera, J.A.; Lim, P.; Galloway, P.A. The Cyclophilin Inhibitor SCY-635 Disrupts HCV NS5A-Cyclophilin A Complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 3888–3897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Hopkins, S.; Scorneaux, B.; Huang, Z.; Murray, M.G.; Wring, S.; Smitley, C.; Harris, R.; Erdmann, F.; Fischer, G.; Ribeill, Y. SCY-635, a novel nonimmunosuppressive analog of cyclosporine that exhibits potent inhibition of hepatitis C virus RNA replication *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 660–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Flisiak, R.; Jaroszewicz, J.; Flisiak, I.; Lapinski, T. Update on alisporivir in treatment of viral hepatitis C. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21*, 375–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Reiss, S.; Rebhan, I.; Backes, P.; Romero-Brey, I.; Erfle, H.; Matula, P.; Kaderali, L.; Poenisch, M.; Blankenburg, H.; Hiet, M.S.; *et al.* Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* **2011**, *9*, 32–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

156. Reiss, S.; Harak, C.; Romero-Brey, I.; Radujkovic, D.; Klein, R.; Ruggieri, A.; Rebhan, I.; Bartenschlager, R.; Lohmann, V. The lipid kinase phosphatidylinositol-4 kinase III alpha regulates the phosphorylation status of hepatitis C virus NS5A. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Trotard, M.; Lepere-Douard, C.; Regeard, M.; Piquet-Pellorce, C.; Lavillette, D.; Cosset, F.L.; Gripon, P.; le Seyec, J. Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *Faseb J.* **2009**, *23*, 3780–3789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Borawski, J.; Troke, P.; Puyang, X.; Gibaja, V.; Zhao, S.; Mickanin, C.; Leighton-Davies, J.; Wilson, C.J.; Myer, V.; Cornellataracido, I.; et al. Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *J. Virol.* **2009**, *83*, 10058–10074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Lamarche, M.J.; Borawski, J.; Bose, A.; Capacci-Daniel, C.; Colvin, R.; Dennehy, M.; Ding, J.; Dobler, M.; Drumm, J.; Gaither, L.A.; et al. Anti-hepatitis C virus activity and toxicity of type III phosphatidylinositol-4-kinase beta inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 5149–5156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Spickler, C.; Lippens, J.; Laberge, M.K.; Desmeules, S.; Bellavance, E.; Garneau, M.; Guo, T.; Hucke, O.; Leyssen, P.; Neyts, J.; et al. Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is essential for replication of human rhinovirus and its inhibition causes a lethal phenotype *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 3358–3368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Keaney, E.P.; Connolly, M.; Dobler, M.; Karki, R.; Honda, A.; Sokup, S.; Karur, S.; Britt, S.; Patnaik, A.; Raman, P.; et al. 2-Alkylloxazoles as potent and selective PI4KIIIbeta inhibitors demonstrating inhibition of HCV replication. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3714–3718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Felmlee, D.J.; Hafirassou, M.L.; Lefevre, M.; Baumert, T.F.; Schuster, C. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins—Impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. *Viruses* **2013**, *5*, 1292–1324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Su, A.I.; Pezacki, J.P.; Wodicka, L.; Brideau, A.D.; Supekova, L.; Thimme, R.; Wieland, S.; Bukh, J.; Purcell, R.H.; Schultz, P.G.; et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15669–15674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Ye, J.; Wang, C.; Sumpter, R., Jr.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L.; Gale, M., Jr. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15865–15870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Kapadia, S.B.; Chisari, F.V. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 2561–2566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Ikeda, M.; Abe, K.; Yamada, M.; Dansako, H.; Naka, K.; Kato, N. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* **2006**, *44*, 117–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Sezaki, H.; Suzuki, F.; Akuta, N.; Yatsuji, H.; Hosaka, T.; Kobayashi, M.; Suzuki, Y.; Arase, Y.; Ikeda, K.; Miyakawa, Y.; et al. An open pilot study exploring the efficacy of fluvastatin, pegylated interferon and ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1b in high viral loads. *Intervirology* **2009**, *52*, 43–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Grammatikos, G.; Farnik, H.; Bon, D.; Bohlig, A.; Bader, T.; Berg, T.; Zeuzem, S.; Herrmann, E. The impact of antihyperlipidemic drugs on the viral load of patients with chronic hepatitis C infection: A meta-analysis. *J. Viral Hepat.* **2014**, *21*, 533–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Ali, N.; Allam, H.; Bader, T.; May, R.; Basalingappa, K.M.; Berry, W.L.; Chandrakesan, P.; Qu, D.; Weygant, N.; Bronze, M.S.; et al. Fluvastatin interferes with hepatitis C virus replication via microtubule bundling and a doublecortin-like kinase-mediated mechanism. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Shan, Y.; Zheng, J.; Lambrecht, R.W.; Bonkovsky, H.L. Reciprocal effects of micro-RNA-122 on expression of heme oxygenase-1 and hepatitis C virus genes in human hepatocytes. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 1166–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Lehmann, E.; El-Tantawy, W.H.; Ocker, M.; Bartenschlager, R.; Lohmann, V.; Hashemolhosseini, S.; Tiegs, G.; Sass, G. The heme oxygenase 1 product biliverdin interferes with hepatitis C virus replication by increasing antiviral interferon response. *Hepatology* **2010**, *51*, 398–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Zhu, Z.; Wilson, A.T.; Luxon, B.A.; Brown, K.E.; Mathahs, M.M.; Bandyopadhyay, S.; McCaffrey, A.P.; Schmidt, W.N. Biliverdin inhibits hepatitis C virus nonstructural 3/4A protease activity: Mechanism for the antiviral effects of heme oxygenase? *Hepatology* **2010**, *52*, 1897–1905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

173. Wuestenberg, A.; Kah, J.; Singethan, K.; Sirma, H.; Keller, A.D.; Rosal, S.R.; Schrader, J.; Loscher, C.; Volz, T.; Bartenschlager, R.; *et al.* Matrix conditions and KLF2-dependent induction of heme oxygenase-1 modulate inhibition of HCV replication by fluvastatin. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e96533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Blanchet, M.; Seidah, N.G.; Labonte, P. SKI-1/S1P inhibition: A promising surrogate to statins to block Hepatitis C virus replication. *Antivir. Res.* **2012**, *95*, 159–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Olmstead, A.D.; Knecht, W.; Lazarov, I.; Dixit, S.B.; Jean, F. Human subtilase SKI-1/S1P is a master regulator of the HCV Lifecycle and a potential host cell target for developing indirect-acting antiviral agents. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Watashi, K.; Inoue, D.; Hijikata, M.; Goto, K.; Aly, H.H.; Shimotohno, K. Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 32765–32772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Chen, Y.; Wang, S.; Yi, Z.; Tian, H.; Aliyari, R.; Li, Y.; Chen, G.; Liu, P.; Zhong, J.; Chen, X.; *et al.* Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase inhibits hepatitis C virus replication via distinct mechanisms. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 7242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Kusuma, A.; Romero-Brey, I.; Berger, C.; Colpitts, C.C.; Boldanova, T.; Engelmann, M.; Todt, D.; Perin, P.M.; Behrendt, P.; Vondran, F.W.; *et al.* Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase restricts hepatitis C virus replication via blockage of membranous web formation. *Hepatology* **2015**, *62*, 702–714.
179. Xiang, Y.; Tang, J.J.; Tao, W.; Cao, X.; Song, B.L.; Zhong, J. Identification of Cholesterol 25-Hydroxylase as a Novel Host Restriction Factor and a Part of the Primary Innate Immune Responses against Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* **2015**, *89*, 6805–6816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Liu, S.Y.; Aliyari, R.; Chikere, K.; Li, G.; Marsden, M.D.; Smith, J.K.; Pernet, O.; Guo, H.; Nusbaum, R.; Zack, J.A.; *et al.* Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol. *Immunity* **2013**, *38*, 92–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Chang, J.; Guo, J.T.; Jiang, D.; Guo, H.; Taylor, J.M.; Block, T.M. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J. Virol.* **2008**, *82*, 8215–8223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Narbus, C.M.; Israelow, B.; Sourisseau, M.; Michta, M.L.; Hopcraft, S.E.; Zeiner, G.M.; Evans, M.J. HepG2 cells expressing microRNA miR-122 support the entire hepatitis C virus life cycle. *J. Virol.* **2011**, *85*, 12087–12092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Kambara, H.; Fukuhara, T.; Shiokawa, M.; Ono, C.; Ohara, Y.; Kamitani, W.; Matsuura, Y. Establishment of a novel permissive cell line for the propagation of hepatitis C virus by expression of microRNA miR122. *J. Virol.* **2012**, *86*, 1382–1393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Da Costa, D.; Turek, M.; Felmler, D.J.; Girardi, E.; Pfeffer, S.; Long, G.; Bartenschlager, R.; Zeisel, M.B.; Baumert, T.F. Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in non-hepatic cells. *J. Virol.* **2012**, *86*, 11919–11925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Fukuhara, T.; Kambara, H.; Shiokawa, M.; Ono, C.; Katoh, H.; Morita, E.; Okuzaki, D.; Maehara, Y.; Koike, K.; Matsuura, Y. Expression of microRNA miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with hepatitis C virus. *J. Virol.* **2012**, *86*, 7918–7933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Jopling, C.L.; Schutz, S.; Sarnow, P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* **2008**, *4*, 77–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Masaki, T.; Arend, K.C.; Li, Y.; Yamane, D.; McGivern, D.R.; Kato, T.; Wakita, T.; Moorman, N.J.; Lemon, S.M. miR-122 stimulates hepatitis C virus RNA synthesis by altering the balance of viral RNAs engaged in replication versus translation. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 217–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Bandiera, S.; Pfeffer, S.; Baumert, T.F.; Zeisel, M.B. miR-122—A key factor and therapeutic target in liver disease. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, 448–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Gebert, L.F.; Rebhan, M.A.; Crivelli, S.E.; Denzler, R.; Stoffel, M.; Hall, J. Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucl. Acids Res.* **2014**, *42*, 609–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Peng, Z.G.; Zhao, Z.Y.; Li, Y.P.; Wang, Y.P.; Hao, L.H.; Fan, B.; Li, Y.H.; Wang, Y.M.; Shan, Y.Q.; Han, Y.X.; *et al.* Host apolipoprotein B messenger RNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G is an innate defensive factor and drug target against hepatitis C virus. *Hepatology* **2011**, *53*, 1080–1089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Zhao, H.; Lin, W.; Kumthip, K.; Cheng, D.; Fusco, D.N.; Hofmann, O.; Jilg, N.; Tai, A.W.; Goto, K.; Zhang, L.; *et al.* A functional genomic screen reveals novel host genes that mediate interferon-alpha's effects against hepatitis C virus. *J. Hepatol.* **2012**, *56*, 326–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

192. Zhu, C.; Xiao, F.; Hong, J.; Wang, K.; Liu, X.; Cai, D.; Fusco, D.N.; Zhao, L.; Jeong, S.W.; Brisac, C.; *et al.* EFTUD2 Is a Novel Innate Immune Regulator Restricting Hepatitis C Virus Infection through the RIG-I/MDA5 Pathway. *J. Virol.* **2015**, *89*, 6608–6618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Zhu, Y.P.; Peng, Z.G.; Wu, Z.Y.; Li, J.R.; Huang, M.H.; Si, S.Y.; Jiang, J.D. Host APOBEC3G protein inhibits HCV replication through direct binding at NS3. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Kozlov, M.V.; Kleymentova, A.A.; Romanova, L.I.; Konduktorov, K.A.; Kamarova, K.A.; Smirnova, O.A.; Prassolov, V.S.; Kochetkov, S.N. Pyridine hydroxamic acids are specific anti-HCV agents affecting HDAC6. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2382–2385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Sato, A.; Saito, Y.; Sugiyama, K.; Sakasegawa, N.; Muramatsu, T.; Fukuda, S.; Yoneya, M.; Kimura, M.; Ebinuma, H.; Hibi, T.; *et al.* Suppressive effect of the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) on hepatitis C virus replication. *J. Cell. Biochem.* **2013**, *114*, 1987–1996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Gong, G.; Waris, G.; Tanveer, R.; Siddiqui, A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9599–9604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Basu, A.; Meyer, K.; Lai, K.K.; Saito, K.; di Bisceglie, A.M.; Grosso, L.E.; Ray, R.B.; Ray, R. Microarray analyses and molecular profiling of Stat3 signaling pathway induced by hepatitis C virus core protein in human hepatocytes. *Virology* **2006**, *349*, 347–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. McCartney, E.M.; Helbig, K.J.; Narayana, S.K.; Eyre, N.S.; Aloia, A.L.; Beard, M.R. Signal transducer and activator of transcription 3 is a proviral host factor for hepatitis C virus. *Hepatology* **2013**, *58*, 1558–1568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Andre, P.; Komurian-Pradel, F.; Deforges, S.; Perret, M.; Berland, J.L.; Sodoyer, M.; Pol, S.; Brechot, C.; Paranhos-Baccala, G.; Lotteau, V. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J. Virol.* **2002**, *76*, 6919–6928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Popescu, C.I.; Riva, L.; Vlaicu, O.; Farhat, R.; Rouille, Y.; Dubuisson, J. Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology* **2014**, *3*, 892–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
201. Gastaminza, P.; Cheng, G.; Wieland, S.; Zhong, J.; Liao, W.; Chisari, F.V. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.* **2008**, *82*, 2120–2129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Pol, A.; Gross, S.P.; Parton, R.G. Review: Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *J. Cell Biol.* **2014**, *204*, 635–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Miyanari, Y.; Atsuzawa, K.; Usuda, N.; Watashi, K.; Hishiki, T.; Zayas, M.; Bartenschlager, R.; Wakita, T.; Hijikata, M.; Shimotohno, K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 1089–1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. DeVita, R.J.; Pinto, S. Current status of the research and development of diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9820–9825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Herker, E.; Harris, C.; Hernandez, C.; Carpentier, A.; Kaehlcke, K.; Rosenberg, A.R.; Farese, R.V., Jr.; Ott, M. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 1295–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Menzel, N.; Fischl, W.; Hueging, K.; Bankwitz, D.; Frentzen, A.; Haid, S.; Gentzsch, J.; Kaderali, L.; Bartenschlager, R.; Pietschmann, T. MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. Zhang, Q.; Gong, R.; Qu, J.; Zhou, Y.; Liu, W.; Chen, M.; Liu, Y.; Zhu, Y.; Wu, J. Activation of the Ras/Raf/MEK pathway facilitates hepatitis C virus replication via attenuation of the interferon-JAK-STAT pathway. *J. Virol.* **2012**, *86*, 1544–1554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
208. Murata, T.; Hijikata, M.; Shimotohno, K. Enhancement of internal ribosome entry site-mediated translation and replication of hepatitis C virus by PD98059. *Virology* **2005**, *340*, 105–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
209. Ndjomou, J.; Park, I.W.; Liu, Y.; Mayo, L.D.; He, J.J. Up-regulation of hepatitis C virus replication and production by inhibition of MEK/ERK signaling. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
210. Pei, R.; Zhang, X.; Xu, S.; Meng, Z.; Roggendorf, M.; Lu, M.; Chen, X. Regulation of hepatitis C virus replication and gene expression by the MAPK-ERK pathway. *Virol. Sin.* **2012**, *27*, 278–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

211. Xu, S.; Pei, R.; Guo, M.; Han, Q.; Lai, J.; Wang, Y.; Wu, C.; Zhou, Y.; Lu, M.; Chen, X. Cytosolic phospholipase A2 gamma is involved in hepatitis C virus replication and assembly. *J. Virol.* **2012**, *86*, 13025–13037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
212. Neveu, G.; Barouch-Bentov, R.; Ziv-Av, A.; Gerber, D.; Jacob, Y.; Einav, S. Identification and targeting of an interaction between a tyrosine motif within hepatitis C virus core protein and AP2M1 essential for viral assembly. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Karaman, M.W.; Herrgard, S.; Treiber, D.K.; Gallant, P.; Atteridge, C.E.; Campbell, B.T.; Chan, K.W.; Ciceri, P.; Davis, M.I.; Edeen, P.T.; *et al.* A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 127–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Yamaguchi, A.; Tazuma, S.; Nishioka, T.; Ohishi, W.; Hyogo, H.; Nomura, S.; Chayama, K. Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver. *Dig. Dis. Sci.* **2005**, *50*, 1361–1371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Tanaka, N.; Moriya, K.; Kiyosawa, K.; Koike, K.; Gonzalez, F.J.; Aoyama, T. PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 683–694. [[PubMed](#)]
216. Jiang, L.; Gu, Y.; Ye, J.; Liu, F.; Zhao, Y.; Wang, C.; Xu, Y.; Cao, X.; Zhang, L.; Dong, W.; *et al.* Resveratrol prevents hepatic steatosis induced by hepatitis C virus core protein. *Biotechnol. Lett.* **2012**, *34*, 2205–2212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
217. Singaravelu, R.; Chen, R.; Lyn, R.K.; Jones, D.M.; O'Hara, S.; Rouleau, Y.; Cheng, J.; Srinivasan, P.; Nasheri, N.; Russell, R.S.; *et al.* Hepatitis C virus induced up-regulation of microRNA-27: A novel mechanism for hepatic steatosis. *Hepatology* **2014**, *59*, 98–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
218. Appel, N.; Zayas, M.; Miller, S.; Krijnse-Locker, J.; Schaller, T.; Friebe, P.; Kallis, S.; Engel, U.; Bartenschlager, R. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
219. Masaki, T.; Suzuki, R.; Murakami, K.; Aizaki, H.; Ishii, K.; Murayama, A.; Date, T.; Matsuura, Y.; Miyamura, T.; Wakita, T.; *et al.* Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J. Virol.* **2008**, *82*, 7964–7976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
220. Camus, G.; Herker, E.; Modi, A.A.; Haas, J.T.; Ramage, H.R.; Farese, R.V., Jr.; Ott, M. Diacylglycerol acyltransferase-1 localizes hepatitis C virus NS5A protein to lipid droplets and enhances NS5A interaction with the viral capsid core. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 9915–9923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
221. Tellinghuisen, T.L.; Foss, K.L.; Treadaway, J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
222. Masaki, T.; Matsunaga, S.; Takahashi, H.; Nakashima, K.; Kimura, Y.; Ito, M.; Matsuda, M.; Murayama, A.; Kato, T.; Hirano, H.; *et al.* Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I-alpha in infectious virus production. *J. Virol.* **2014**, *88*, 7541–7555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Kim, S.; Jin, B.; Choi, S.H.; Han, K.H.; Ahn, S.H. Casein kinase II inhibitor enhances production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (H77S). *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Siddiqui-Jain, A.; Drygin, D.; Streiner, N.; Chua, P.; Pierre, F.; O'Brien, S.E.; Bliesath, J.; Omori, M.; Huser, N.; Ho, C.; *et al.* CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 10288–10298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Huang, H.; Sun, F.; Owen, D.M.; Li, W.; Chen, Y.; Gale, M., Jr.; Ye, J. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5848–5853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
226. Tiwari, S.; Siddiqui, S.A. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 1079–1086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
227. Long, G.; Hiet, M.S.; Windisch, M.P.; Lee, J.Y.; Lohmann, V.; Bartenschlager, R. Mouse hepatic cells support assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 1057–1066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
228. Benga, W.J.; Krieger, S.E.; Dimitrova, M.; Zeisel, M.B.; Parnot, M.; Lupberger, J.; Hildt, E.; Luo, G.; McLauchlan, J.; Baumert, T.F.; *et al.* Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **2010**, *51*, 43–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

229. Cun, W.; Jiang, J.; Luo, G. 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.* **2010**, *84*, 11532–11541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
230. Boyer, A.; Dumans, A.; Beaumont, E.; Etienne, L.; Roingeard, P.; Meunier, J.C. The association of hepatitis C virus glycoproteins with apolipoproteins E and B early in assembly is conserved in lipoviral particles. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 18904–18913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
231. Lee, J.Y.; Acosta, E.G.; Stoeck, I.K.; Long, G.; Hiet, M.S.; Mueller, B.; Fackler, O.T.; Kallis, S.; Bartenschlager, R. Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins. *J. Virol.* **2014**, *88*, 12422–12437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
232. Coller, K.E.; Heaton, N.S.; Berger, K.L.; Cooper, J.D.; Saunders, J.L.; Randall, G. Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Cheng, Y.L.; Lan, K.H.; Lee, W.P.; Tseng, S.H.; Hung, L.R.; Lin, H.C.; Lee, F.Y.; Lee, S.D. Amiodarone inhibits the entry and assembly steps of hepatitis C virus life cycle. *Clin. Sci.* **2013**, *125*, 439–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
234. Raval, S.K.; Raval, P.S.; Jain, M.R. Emerging therapies for dyslipidemia: Known knowns and known unknowns of MTP inhibitors. *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* **2012**, *6*, 24–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
235. Li, X.; Jiang, H.; Qu, L.; Yao, W.; Cai, H.; Chen, L.; Peng, T. Hepatocyte nuclear factor 4alpha and downstream secreted phospholipase A2 GXIIB regulate production of infectious hepatitis C virus. *J. Virol.* **2014**, *88*, 612–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
236. Anderson, L.J.; Lin, K.; Compton, T.; Wiedmann, B. Inhibition of cyclophilins alters lipid trafficking and blocks hepatitis C virus secretion. *Virol. J.* **2011**, *8*, 329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
237. Peng, Z.G.; Fan, B.; Du, N.N.; Wang, Y.P.; Gao, L.M.; Li, Y.H.; Liu, F.; You, X.F.; Han, Y.X.; Zhao, Z.Y.; *et al.* Small molecular compounds that inhibit hepatitis C virus replication through destabilizing heat shock cognate 70 messenger RNA. *Hepatology* **2010**, *52*, 845–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
238. Chen, D.Z.; Jiang, J.D.; Zhang, K.Q.; He, H.P.; Di, Y.T.; Zhang, Y.; Cai, J.Y.; Wang, L.; Li, S.L.; Yi, P.; *et al.* Evaluation of anti-HCV activity and SAR study of (+)-lycoricidine through targeting of host heat-stress cognate 70 (Hsc70). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2679–2682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
239. Du, N.N.; Peng, Z.G.; Bi, C.W.; Tang, S.; Li, Y.H.; Li, J.R.; Zhu, Y.P.; Zhang, J.P.; Wang, Y.X.; Jiang, J.D.; *et al.* N-substituted benzyl matrixic acid derivatives inhibit hepatitis C virus (HCV) replication through down-regulating host heat-stress cognate 70 (Hsc70) expression. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
240. Chen, D.; Cai, J.; Yin, J.; Jiang, J.; Jing, C.; Zhu, Y.; Cheng, J.; Di, Y.; Zhang, Y.; Cao, M.; *et al.* Lycorine-derived phenanthridine downregulators of host Hsc70 as potential hepatitis C virus inhibitors. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 561–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
241. Parent, R.; Qu, X.; Petit, M.A.; Beretta, L. The heat shock cognate protein 70 is associated with hepatitis C virus particles and modulates virus infectivity. *Hepatology* **2009**, *49*, 1798–1809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
242. Lavie, M.; Goffard, A.; Dubuisson, J. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2007**, *9*, 71–86. [[PubMed](#)]
243. Soriano, V.; Vispo, E.; Poveda, E.; Labarga, P.; Barreiro, P. Treatment failure with new hepatitis C drugs. *Expert Opin. Pharmacother.* **2012**, *13*, 313–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
244. Tong, X.; le Pogam, S.; Li, L.; Haines, K.; Piso, K.; Baronas, V.; Yan, J.M.; So, S.S.; Klumpp, K.; Najera, I. *In vivo* emergence of a novel mutant L159F/L320F in the NS5B polymerase confers low-level resistance to the HCV polymerase inhibitors mericitabine and sofosbuvir. *J. Infect. Dis.* **2014**, *209*, 668–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
245. Donaldson, E.F.; Harrington, P.R.; O’Rear, J.J.; Naeger, L.K. Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for sofosbuvir. *Hepatology* **2015**, *61*, 56–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Bush, C.O.; Greenstein, A.E.; Delaney, W.E.T.; Beran, R.K. Hepatitis C viral entry inhibitors prolong viral suppression by replication inhibitors in persistently-infected Huh7 cultures. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e65273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

247. Xiao, F.; Fofana, I.; Heydmann, L.; Barth, H.; Soulier, E.; Habersetzer, F.; Doffoel, M.; Bukh, J.; Patel, A.H.; Zeisel, M.B.; *et al.* Hepatitis C virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
248. Lanford, R.E.; Hildebrandt-Eriksen, E.S.; Petri, A.; Persson, R.; Lindow, M.; Munk, M.E.; Kauppinen, S.; Orum, H. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **2010**, *327*, 198–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
249. Puyang, X.; Poulin, D.L.; Mathy, J.E.; Anderson, L.J.; Ma, S.; Fang, Z.; Zhu, S.; Lin, K.; Fujimoto, R.; Compton, T.; *et al.* Mechanism of resistance of hepatitis C virus replicons to structurally distinct cyclophilin inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 1981–1987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
250. Coelmont, L.; Hanouille, X.; Chatterji, U.; Berger, C.; Snoeck, J.; Bobardt, M.; Lim, P.; Vliegen, I.; Paeshuyse, J.; Vuagniaux, G.; *et al.* DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
251. Garcia-Rivera, J.A.; Bobardt, M.; Chatterji, U.; Hopkins, S.; Gregory, M.A.; Wilkinson, B.; Lin, K.; Galloway, P.A. Multiple mutations in hepatitis C virus NS5A domain II are required to confer a significant level of resistance to alisporivir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 5113–5121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
252. Lim, P.J.; Galloway, P.A. Hepatitis C NS5A protein: Two drug targets within the same protein with different mechanisms of resistance. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *8*, 30–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
253. Israelow, B.; Mullokandov, G.; Agudo, J.; Sourisseau, M.; Bashir, A.; Maldonado, A.Y.; Dar, A.C.; Brown, B.D.; Evans, M.J. Hepatitis C virus genetics affects miR-122 requirements and response to miR-122 inhibitors. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
254. Colpitts, C.C.; Zeisel, M.B.; Baumert, T.F. When one receptor closes, another opens: Claudins and the hepatitis C virus E1 glycoprotein. *Hepatology* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**NOUVEAUX ROLES DE L'APOLIPOPROTEINE E DANS
LE CYCLE DU VIRUS DE L'HEPATITE C :
DOCTEUR JEKYLL OU MISTER HYDE ?**

RESUME : L'infection par le virus de l'hépatite C (HCV) est une cause majeure d'hépatite chronique, de cirrhose hépatique et ce carcinome hépatocellulaire dans le monde. La compréhension des relations entre le virus et sa cellule hôte, l'hépatocyte, est indispensable pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et d'un vaccin préventif. La particularité de ce virus est son lien étroit avec le métabolisme lipidique. Le virus circule dans le sang associé aux lipoprotéines, formant une lipo-viro-particule (LVP) infectieuse. L'apolipoprotéine E (apoE) est une protéine cellulaire faisant intégralement partie de la LVP. Elle joue un rôle majeur dans l'infection et à la production des particules virales. Durant ce travail de thèse, j'ai pu approfondir les connaissances sur le rôle d'apoE dans le cycle viral du HCV sous deux aspects très différents. D'une part, j'ai démontré que la forme libre d'apoE, non liée aux lipoprotéines, inhibe la réplication du HCV en régulant du métabolisme lipidique hépatique et en induisant un efflux de cholestérol ABCG1-dépendant. D'autre part, j'ai participé à une étude démontrant que l'apoE liée à la LVP contribue à l'échappement du virus au système immunitaire, en masquant les épitopes de la protéine virale E2 aux anticorps neutralisants. Ces études ont mis en évidence deux nouveaux rôles d'apoE dans la pathogenèse du HCV.

Mots-clés : Virus de l'hépatite C, apolipoprotéine E, HDL, ABCG1, métabolisme lipidique, anticorps neutralisants

ABSTRACT: Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma worldwide. Understanding virus-host interactions in hepatocytes will contribute towards the development of new therapeutic strategies and a protective vaccine. HCV life cycle and the lipid metabolism are inextricably intertwined. A particular feature of this virus is that, in the blood, HCV virions are associated with lipoproteins, forming an infectious lipoviroparticle (LVP). Apolipoprotein E (apoE) is a key component of LVPs that plays an essential role in HCV entry and virions production. My PhD project entailed a more detailed dissection of apoE's role in the HCV life cycle. I demonstrated that lipid-free apoE inhibits HCV replication by regulating the hepatic lipid metabolism *via* an ABCG1-dependent cholesterol efflux. Furthermore, I contributed to a study demonstrating that LVP-associated apoE helps the virus escape host immunity by blocking access of neutralizing antibodies to the viral glycoprotein E2. The work presented highlights two new roles of apoE in HCV pathogenesis

Key words: Hepatitis C virus, apolipoprotein E, HDL, ABCG1, lipid metabolism, neutralizing antibodies