



HAL
open science

Identification de composés naturels inhibant le virus de l'hépatite C

Marie-Emmanuelle Sahuc

► **To cite this version:**

Marie-Emmanuelle Sahuc. Identification de composés naturels inhibant le virus de l'hépatite C. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S056 . tel-01930887

HAL Id: tel-01930887

<https://theses.hal.science/tel-01930887>

Submitted on 22 Nov 2018

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2

Ecole doctorale Biologie-Santé de Lille

Pour l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université de Lille 2

**Identification de composés naturels inhibant
le virus de l'hépatite C**

Présentée et soutenue publiquement par :

Marie-Emmanuelle Sahuc

Le 22 Mai 2017

Devant le jury composé de :

Pr Didier Hober	Président
Dr François Helle	Rapporteur
Dr Jacques Le Seyec	Rapporteur
Pr Sevser Sahpaz	Examinatrice
Pr Philip Meuleman	Examineur
Dr Karin Séron	Directrice de thèse

*A Timothée,
A mes parents,*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, le Pr Didier Hober, le Dr François Helle, le Dr Jacques le Seyec, le Pr Philip Meuleman et le Pr Sevser Sahpaz, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je remercie l'Université Lille II qui a financé ces trois années de thèse.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire pour ces trois années passées à vos côtés.

Merci à Jean de m'avoir permis de rejoindre ton laboratoire. Tout d'abord lors d'un stage d'été entre mon année de Master 1 et de Master 2. Puis lors de mon stage de Master 2. Merci de m'avoir donné l'opportunité au cours de ces trois années de présenter mon travail lors de plusieurs congrès.

Un grand merci à Karin, ma directrice de thèse, pour m'avoir formé scientifiquement et humainement pendant ces trois années. Merci pour ta confiance, ta patience, et ta grande disponibilité. Merci de m'avoir poussé toujours avec beaucoup de délicatesse à donner le meilleur de moi-même. Merci de m'avoir impliquée dans autant de collaboration, elles m'ont permis d'apprendre à travailler avec plein de personnes extraordinaires de cultures différentes.

Merci à Yves d'avoir suivi mes manip et mes résultats au cours de ma thèse. Merci pour ton aide scientifique au cours de nos réunions.

Merci à Sandrine, pour ton aide et tes réponses aux nombreuses questions techniques que je me posais au cours de mes manip. Merci pour toutes ces petites discussions qu'on a eu au P2 ou en culture.

Merci à Nathalie pour ta bonne humeur et tes nombreuses histoires marrantes durant l'heure du déjeuner. Heureusement que tu étais là pour me rappeler l'heure du déjeuner quand j'étais en retard de quelques minutes.

Merci à Muriel pour ta précieuse aide dans ces dernières manips de thèse, sans toi et ton expertise je pense que je n'aurais jamais réussi à produire mes virus résistants. Merci pour ta disponibilité.

Merci à Claire pour ta bonne humeur permanente, merci aussi de m'avoir aidé lors de la manip avec les cellules de drosophiles.

Merci Adeline pour ta disponibilité lorsque j'avais besoin d'un renseignement, et pour les bons moments passés ensemble durant l'heure du déjeuné.

Merci à Czes pour ta patience ces derniers temps lorsque je m'asseyais régulièrement sur ton tabouret pour papoter avec Laura. Merci pour ta bonne humeur et tes blagues.

Merci à Anne de m'avoir donné le bon contact pour pouvoir faire du monitorat au cours de ces trois années. Ce fut une expérience très enrichissante.

Merci à Soph pour ton aide quand j'avais un problème avec mon ordinateur. Merci aussi pour tes conseils que ça soit pour le laboratoire ou ailleurs.

Merci à Laurence et à Cécile-Marie pour les bons moments passés à vos côtés.

Un grand merci à Laura pour nos nombreuses discussions, pour ton écoute et tes conseils. J'ai appris beaucoup de choses à tes côtés. Bonne continuation en Californie !

Merci à Ariane, pour nos discussions et ton écoute ! Merci aussi de venir si souvent t'occuper du lapin quand nous sommes absents !! Bon courage pour la fin de ta thèse.

Merci à Rehab pour nos petites discussions en Anglais. Elles m'ont permis de progresser plus rapidement !

Merci à Annabelle pour ta bonne humeur, tes blagues et tes articles drôles sur le labo !

Merci à Maliki pour ta bonne humeur et ton rire communicatif.

Merci à Nadjat, Juliano, Juliette pour les bons moments passés ensemble.

Merci à Lucie pour m'avoir hébergée durant une semaine au début de ma thèse. Merci pour les bons moments passés ensemble durant tes fameuses « pauses thé ».

Merci à Rayan pour ta bonne humeur et tes blagues.

Merci à Nana pour ton écoute, tes nombreux conseils et les bons moments passés ensemble.

Merci à Borris, Moussa, Ramla et Pritom. Travailler avec vous fut un réel plaisir. Bonne continuation à chacun d'entre vous.

Merci à Kévin et Karoline. Bonne continuation en thèse !

Merci à toutes les personnes que j'ai croisé au cours de ma thèse mais que je n'ai pas citées.

Merci à ma sœur pour avoir supporté le rythme de vie que j'avais lorsqu'on était à la fac, pour nos discussions, pour les nombreux et excellents moments passés ensemble et ceux à venir !

Merci Claire pour les vacances passées ensemble et les nombreux moments passés partagés.

Merci Anne pour toutes nos discussions qui nous permettent d'avancer à notre rythme et pour les week-ends passés ensemble à Paris à refaire le monde.

Merci Anne-Solène pour ton écoute et les we passés ensemble. Bon courage pour ta soutenance de thèse !

Merci à Julie pour ta présence et ton écoute permanente. Bon courage à toi dans cette nouvelle voie que tu as choisie de suivre.

Merci Papa et Maman pour tous ce que vous avez fait pour moi ! Merci de m'avoir toujours encouragée, aidée, soutenue et accompagnée au cours de ces 27 années et tout particulièrement ces trois dernières années. Sans vous je ne serais pas là où j'en suis aujourd'hui. Merci pour vos nombreux conseils et nombreuses discussions qui ont permis de me construire jour après jour.

Merci à toi Timothée pour ta présence quotidienne à mes côtés, pour la joie et le bonheur que tu mets dans ma vie. Merci pour ton soutien sans faille ces derniers temps, pour tes mots réconfortants et encourageants dans les moments difficiles.

Table des matières

I. Le virus de l'hépatite C	29
I.1 Découverte et identification du virus de l'hépatite C	29
I.2 Le VHC	32
I.3 La polyprotéine du VHC	33
I.3.a La région 5' non codante	33
I.3.b La région 3' non codante	34
I.3.c Clivage de la polyprotéine	34
I.3.d Les protéines structurales	36
I.3.d.i Core	36
I.3.d.ii La protéine F	38
I.3.d.iii Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2	40
I.3.e Les protéines non structurales	44
I.3.e.i La protéine P7	44
I.3.e.ii NS2	45
I.3.e.iii Le complexe NS3-4A	45
I.3.e.iv NS4B	46
I.3.e.v NS5A.....	48
I.3.e.vi NS5B	49
I.4 Le cycle viral du VHC	50
I.4.a Entrée du VHC dans les cellules hépatocytaires	51
I.4.a.i Les facteurs d'attachement.....	51
I.4.b Internalisation, endocytose et fusion	58
I.4.c Traduction	59
I.4.d Réplication	59
I.4.d.i Régulation de la réplication par les protéines cellulaires	60
I.4.e Assemblage et propagation du VHC	61
I.4.f Transmission cellule-cellule	62
I.5 Modèles d'études	65
I.5.a Système <i>in vitro</i>	65
I.5.a.i La protéine E2 soluble.....	65
I.5.a.ii Le réplicon subgénomique	66
I.5.a.iv Les VHCpp	67
I.5.a.iii Le système VHCcc	70
I.5.a.v Le système de cellule permissive au VHC.....	72
I.5.b Les modèles <i>in vivo</i>	74
I.5.b.i Chimpanzé.....	74
I.5.b.ii Tupaia	74
I.5.b.iii Souris génétiquement humanisées	75
I.5.b.iv Souris xénotransplantées avec un foie humain.....	76
I.6 Epidémiologie	77
1.6. a Prévalence et distribution géographique	77
1.6. b Hétérogénéité génétique et évolution moléculaire	79
1.6. b. i Insertion de mutation	80
1.6. b. ii Dérive génétique	80
1.6. b. iii Recombinaison	80
1.6. c Mode de transmission	81

I. 7 Description de l'hépatite C	81
I.7.a Hépatite aiguë	82
I.7. b Hépatite chronique	84
I.7.c Fibrose	85
I.7.d Cirrhose et carcinome hépatocellulaire	86
I.7.d Manifestations extra-hépatiques	87
I.8 Diagnostic VHC	87
I.9 Mise en place d'un traitement	88
I.9.a Mise en place d'une bithérapie	89
I.9.a.i IFN- α	89
I.9.a.ii IFN- α et ribavirine	90
I.9.a.iii PolyÉthylène Glycol -IFN- α (PEG-IFN- α) et ribavirine.....	90
I.9.b Les molécules ciblant directement le VHC	91
I.9.b.i Inhibiteurs de la protéase NS3-4A	92
I.9.b.ii Inhibiteur de NS5A.....	94
I.9.b.iii Inhibiteur de la RdRp NS5B.....	95
I.9.b.iiii Molécules ciblant les glycoprotéines d'enveloppe	97
I.9.c. Agents antiviraux dirigés contre la cellule hôte	99
I.9. d Traitement en fonction des génotypes viraux	100
I.9.e Facteurs influençant l'efficacité des traitements	101
I. 9. e. i Facteurs de l'hôte	101
I.9. e. ii Virus résistants aux DAAs	104
I.9. f Mise au point d'un vaccin	106
II/ Composés naturels inhibant le VHC	109
II.1 Les composés phénoliques	112
II.1.a Lignanes et flavolignanes	112
II.1.b Les tanins	113
II.1.c Flavonoïdes	113
II.1.d Les diarylhéptanoïdes	115
II.2 Les terpènes	116
II.2.a Saponines	116
II.3 Les alcaloïdes	117
II.4 Les porphyrines	117
II.5- Exemples de l'EGCG et de la delphinidine comme inhibiteurs du VHC	118
II.5.a. L'EGCG	118
II.5.a.i Propriétés pharmacocinétiques chez l'homme	119
II. 5.b.ii Propriétés anti-carcinogène	120
II. 5.b.iii Propriétés antibactériennes	121
II. 5.b.iv Propriétés neuroprotectrices.....	122
II. 5.b.v Propriétés antivirales	122
II.5.b La delphinidine	125
II.5.b.i Pharmacocinétique	126
II.5.b.ii Effets bénéfiques chez l'homme.....	128
III. Les plantes extrémophiles comme source de nouvelles molécules	128
III.1 Exemple : le <i>Juncus maritimus</i>	129
III.1.a Description botanique	129
III.1.b Distribution et écologie	129
III.1.c Rôle du <i>J. maritimus</i>	130

Contexte	135
Objectifs	139
Partie 1 : Nouveau mécanisme d'action de polyphénols inhibant l'entrée du VHC	141
Partie 2 : Identification du déhydrojuncusol, un composé naturel extrait du <i>J. maritimus</i>, comme nouvel inhibiteur de la réplication du VHC	142
Résultats	145
Partie 1 :	147
Nouveau mécanisme d'action de polyphénols inhibant l'entrée du VHC	147
Partie 2 :	155
Identification du déhydrojuncusol, un composé naturel extrait du <i>J. maritimus</i> , un nouvel inhibiteur de la réplication du VHC	155
Partie 3 :	183
Identification de composé actif contre le VHC à partir d'extraits bruts de plantes Ivoiriennes.....	183
Discussions	195
Partie 1 : Nouveau mécanisme d'action de polyphénols inhibant l'entrée du VHC	197
Partie 2 : Identification du déhydrojuncusol, un composé naturel extrait du <i>J.</i> <i>maritimus</i>, un nouvel inhibiteur de la réplication du VHC.....	199
Conclusions et perspectives	203
Bibliographie	209
Annexe	281
Liste des publications	287

Liste des figures

Figure 1 : Phylogénie des <i>Flaviviridae</i>	31
Figure 2 : Représentation schématique du VHC.....	31
Figure 3 : Représentation de la région 5'UTR et 3'UTR de l'ARN viral du VHC	35
Figure 4 : Clivage de la polyprotéine du VHC.....	37
Figure 5 : Représentation schématique de la protéine core.....	39
Figure 6 : Représentation des différentes régions hypervariables de E2.....	43
Figure 7: Représentation schématique du complexe NS3-4A.....	47
Figure 8 : Description schématique de la protéine NS4B.....	47
Figure 9: Description schématique de la phosphoprotéine NS5A.....	47
Figure 10: Schématisation de la protéine NS5B sous forme de main droite.....	50
Figure 11: Cycle viral du VHC.....	64
Figure 12: Réplicon bi-cistronique et réplicon mon-ocistronique	67
Figure 13: Modèle cellulaire VHCpp.....	69
Figure 14: Modèle de culture VHCcc	71
Figure 15: Diversité génétique du VHC et variabilité des prévalences dans les continents.....	78
Figure 16 : Répartition des différents génotypes et sous-types du VHC.....	78
Figure 17: Evolution d'une hépatite C causée par le VHC.....	82
Figure 18: Inhibiteurs agissant spécifiquement sur le VHC commercialisé.....	95
Figure 19: Traitement du virus de l'hépatite C approuvé ou en cours de développement.....	97
Figure 20: Classes de composés naturels issues de plantes inhibant le VHC	109
Figure 21: Structure chimique des trois molécules présentes dans la silymarine.....	112
Figure 22: Structure chimique de la quercétine.....	112
Figure 23: Structure chimique de la naringénine.....	112
Figure 24: Structure chimique de la curcumine.....	115
Figure 25: Structure chimique de la glycyrrhizine.....	115
Figure 26: Structure chimique des 4 catéchines les plus abondantes dans le thé vert.....	115
Figure 27: Structure chimique du chlorure de delphinidine.....	125
Figure 28: Illustration botanique du <i>Juncus</i>	129

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractérisation clinique des deux premiers types d'hépatites	29
Tableau 2 : Administration des différents traitements en fonction du génotype.....	100
Tableau 3 : Principales mutations de résistance apparaissant après l'utilisation des différents DAAs.....	101
Tableau 4 : Action de l'EGCG sur différents virus.....	121

Liste des abréviations

A

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALAT : Alanine Amino Transférase

Apo : Apolipoprotéine

ARF : *Alternative Reading Frame Protein*

ASAT : Aspartate Amino Transférase

ARN : Acide-ribonucleique

B

BVDV : Bovine Viral Diarrhea Virus

C

CD81 : *Cluster of differentiation 81*

CLDN 1 : Claudin 1

CSFV : Classical Swine Fever Virus

D

DAA : *Direct Antiviral Agent*

DGAT1 : Diacylglycerol acyltransferase 1

DC-SIGN : *Dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3- grabbing nonintegrin*

DENV : Dengue Virus

DMV : *Double Membranes Vesicles*

E

E1 : Glycoprotéine d'enveloppe E1

E2 : Glycoprotéine d'enveloppe E2

E2s : Glycoprotéine d'enveloppe E2 soluble

ELISA : *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EMCV : *Encephalomyocarditis Virus*

EGCG : *Epigallocatechine-3-gallate*

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*

ESCRT : *Endosomal-Sorting complex required for transport*

G

GAG : *Glycosaminoglycane*

GBF1 : *Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1*

GBV : *GB virus*

H

HCV : *Hepatitis C Virus*

HDL : *High Density Lipoprotein*

HEK : *Human embryonic kidney*

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*

HSPG : *Heparan Sulfate Proteoglycan*

HVR : *Hypervariable Region*

I

IFN : *Interféron*

igVR : *Intergenotypic Variable Region*

IRES : *Internal Ribosome Entry Site*

J

JEV : *Japanese Encephalitis Virus*

JFH1 : *Japanese Fulminant Hepatitis*

K

Kb : Kilobase

L

La : *La autoantigen*

LCS : *Low Complexity Sequences*

LDL : *Low Density Lipoprotein*

LEL : *Long Extracellular Loop*

L-SIGN : *Liver/lymph node-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*

LTR : *Long Terminal Repeat*

M

MPCC : *Micropatterned Co-Cultures*

MLV : *Murine Leukemia Virus*

N

NANB : *Non-A Non-B*

NPC1L1 : *Niemann–Pick C1-like 1*

Nt : *Nucléotide*

NTR : *Non-Translated Regions*

O

OCLN : *Occludine*

ORF : *Open Reading Frame*

P

PEG : *Polyéthylène Glycol*

PRK2 : *Protein kinase C-related kinase 2*

PTB : *Polypyrimidine Tract-Binding protein*

R

RdRp : *RNA-dependent RNA polymerase*

RE : *Reticulum Endoplasmique*

RMN : *Résonance Magnétique Nucléaire*

RT-PCR : *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

S

SCID : *Severe Combined ImmunoDeficiency*

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

SP : *Signal peptidase*

SPP : *Signal peptide peptidase*

SR-BI : *Récepteur Scavenger de Type B de classe I*

SVR : *Sustained Viral Response*

T

TDM : *Domaine Transmembranaire*

TfR : *Récepteur Transferrine*

U

UTR : *Untranslated Transcribed Region*

V

VAP : *Vesicle-associated membrane protein-associated protein*

VHA : *Virus de l'Hépatite A*

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VHCcc : Virus de l'hépatite C produit en culture cellulaire

VHCpp : Pseudoparticule du VHC

VHCtcp : VHC trans-complémenté

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLDL : *Very Low Density Lipoproteins*

VLP : *Virus-like particle*

W

WNV : West Nile Virus

Wt : *Wild-type*

Y

YFV : Yellow Fever Virus

Z

ZIKV : Zika virus

Résumé

L'hépatite C est une maladie affectant aujourd'hui 170 millions d'individus dans le monde. Cette maladie est causée par le virus de l'hépatite C (VHC). Les nouveaux traitements récemment mis sur le marché, visant à soigner l'hépatite C, sont très onéreux et donc inaccessibles pour les pays du Sud. De plus, l'utilisation de ces nouvelles molécules engendre l'apparition de mutation de résistance virale responsable de l'échec des traitements pour 5 à 10% des patients. La découverte de nouveaux antiviraux est donc toujours indispensable. Les plantes utilisées en médecine traditionnelle depuis des siècles sont une source de composés bio-actifs très intéressante. L'utilisation de ces plantes ou de composés naturels en complément des molécules utilisées en thérapie classique, permettrait de réduire significativement le coût de ces traitements et de les rendre accessibles à davantage de patients.

L'epigallocatechine-3-gallate (EGCG) et la delphinidine sont des molécules naturelles issues respectivement du thé vert et des fruits rouges. Ces deux molécules inhibent l'étape d'entrée du VHC dans les cellules hépatocytaires. Nous avons montré que l'EGCG et la delphinidine inhibent cette étape virale dans les hépatocytes en déformant les particules et bloquant ainsi leur attachement à la surface cellulaire. Nous nous sommes ensuite intéressés au processus engendrant cette déformation qui est probablement lié à l'agrégation des glycoprotéines d'enveloppe virale.

Nous avons procédé au criblage d'extraits bruts de plantes extrêmophiles tunisiennes et mis en évidence que l'extrait brut de rhizome de *Juncus maritimus* inhibait l'étape de réplication du VHC. Le *J. maritimus* est une plante fortement présente dans les sols arides en Tunisie mais également sur les côtes françaises. En collaboration avec le laboratoire de Pharmacognosie de Lille et grâce à un fractionnement bioguidé, le principe actif a pu être isolé. Il s'agit du déhydrojuncusol qui inhibe la réplication virale avec une concentration effective médiane de 1,31 μM . De plus, nous avons montré que le déhydrojuncusol pouvait inhiber la réplication de virus présentant des mutations de résistance aux traitements actuels ciblant la protéine virale NS5A. Nous avons cherché à identifier la cible virale du déhydrojuncusol et il semblerait que ce soit également la protéine NS5A.

Les résultats obtenus dans cette thèse confortent l'hypothèse que des molécules naturelles pourraient être utilisées dans le traitement de l'hépatite C.

Abstract

Hepatitis C is a liver disease affecting 170 million people worldwide. This disease is caused by hepatitis C virus (HCV). New treatments, recently marketed, against HCV are very expensive and not really accessible for most-infected patients especially in low-income countries. Moreover, the use of these new molecules generates the emergence of HCV resistant variants responsible for treatment failure for 5 to 10% of the patients. Therefore, the discovery of new antiviral molecules is always needed. Since centuries, plants are used in traditional medicine. They are a very attractive source of bio-active compounds. Plant extracts or natural molecules used in combination with actual therapy, could significantly reduce the cost of these new treatments and render them accessible to more patients.

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and delphinidin are natural molecules derived respectively from green tea and red berries. These two molecules inhibit HCV entry into hepatocyte cells. We have shown that this inhibition is due to a deformation of viral particles by the molecules inducing a blockade of virus attachment to the cell surface. We further investigated the process leading to this deformation, and conclude that it might be related to aggregation of viral envelope glycoproteins.

We screened extracts of extremophile plants from Tunisia and showed that the crude extract of *Juncus maritimus* rhizome inhibited HCV replication step. *J. maritimus* is a plant present in arid soils in Tunisia but also in French coasts. In collaboration with the Pharmacognosy laboratory of Lille and thanks to a bioguided fractionation, the active compound present in this plant could be isolated. It was identified as dehydrojuncusol, which inhibits viral replication with a half maximal effective concentration of 1.31 μM . We have also shown that dehydrojuncusol is able to inhibit replication of viruses with resistance mutations to current treatments targeting the viral protein NS5A. We have also tried to identify the viral target of dehydrojuncusol, and it seems that the target might also be the NS5A protein.

The results obtained in this thesis confirm the hypothesis that natural molecules could be used in the treatment of hepatitis C.

Introduction

I. Le virus de l'hépatite C**I.1 Découverte et identification du virus de l'hépatite C**

Au cours des années 1960-1970, deux premiers types d'hépatites ont été mis en évidence cliniquement. Il s'agit de l'hépatite infectieuse qui sera nommée par la suite « hépatite A » et de l'hépatite sérique nommée « hépatite B ». Les premières caractéristiques de ces deux types d'hépatites sont répertoriées ci-dessous :

	Hépatite infectieuse	Hépatite sérique
Période d'incubation	Courte : 1 à 3 semaines	Longue : 1 à 3 mois
Transmission	Fécale-orale	Parentérale et sexuelle
Degré de contagion	Elevé	Faible
Sévérité de la maladie	Aigüe parfois fatale	Aigüe (limité) parfois sévère
Evolution	Pas de chronicité ni de cirrhose	Chronique et cirrhose

Tableau 1: Caractérisation clinique des deux premiers types d'hépatites
Description détaillée de l'hépatite infectieuse et de l'hépatite sérique en fonction de la période d'incubation, du type de transmission, du degré de contagion, de la sévérité et de l'évolution de la maladie (D'après (Krugman et al., 1967)).

C'est en 1964 que l'équipe de Baruch Blumberg met en évidence dans le sérum d'un aborigène Australien un nouvel antigène appelé dans un premier temps « antigène Australia », et plus tard « antigène Hbs » (Blumberg et al., 1965). Cet antigène est associé, en 1968, à l'hépatite sérique aussi appelée hépatite post-transfusionnelle (Prince, 1968). Par la suite, des tests de détection systématiques de l'agent infectieux Hbs sont mis en place, permettant d'éliminer lors des transfusions sanguines les poches de sang contaminées. Ces premiers tests sérologiques permettent alors de différencier l'agent infectieux responsable de l'hépatite B de l'agent responsable de l'hépatite A (Gocke, 1972; Bamber et al., 1981). Cependant après la mise en place de ces tests, le nombre d'individus développant les symptômes d'une hépatite après transfusion sanguine ne diminue que de 60%. Les chercheurs pensent alors que les cas résiduels d'hépatites observés sont dus à l'efficacité partielle des tests détectant l'antigène Hbs (Alter et al., 1972).

En 1970, Dane et ces collaborateurs ont mis en évidence que l'agent infectieux responsable des hépatite B était un virus, logiquement nommé le virus de l'hépatite B (VHB) (Dane et al., 1970). En 1975 sont publiés les premiers résultats de vaccination contre le VHB en utilisant l'antigène Hbs présent dans le plasma d'individus porteur chronique de l'hépatite B (Maupas et al., 1976). Un vaccin, composé de l'antigène Hbs et obtenu par génie génétique est administré dans le monde entier en 1986. C'est le seul autorisé en France actuellement (Launay and Floret, 2015). En 1976, le virus de l'hépatite A (VHA) est formellement caractérisé dans les selles de patients souffrant d'hépatite aigüe, et donc identifié comme étant l'agent responsable des hépatites infectieuses (Skidmore and Tadros, 1976). Les essais cliniques pour un vaccin inactivé contre l'hépatite A sont publiés en 1993 (Jilg, 1993). Ce vaccin est disponible pour la première fois entre 1995 et 1996 aux Etats Unis (Matheny and Kingery, 2012). Les enfants se trouvant dans les zones à risques sont les premiers vaccinés en 1996, puis en 1999 le vaccin est distribué partout dans le monde (The history of vaccine. 2011).

L'ensemble de ces découvertes a montré que les transmissions d'hépatites virales post-transfusionnelles résiduelles n'étaient dues ni au VHA ni au VHB, mais qu'elles étaient dues à un autre virus. L'agent responsable de ces hépatites fut nommé dans un premier temps « virus non-A non-B » (NANB) (Feinstone et al., 1975; McCaul et al., 1982; Dienstag et al., 1983).

Les premières caractéristiques du virus NANB furent mises en évidence:

- La particule a un diamètre compris entre 40 et 60 nm.
- Le virus est enveloppé
- Il est sensible à la chaleur et à l'inactivation par le chloroforme
- La transmission parentérale est majoritaire
- La transmission sexuelle ou materno-fœtale est rare
- La phase d'infection est asymptomatique
- Plusieurs cas d'hépatites sévères pouvant aller de l'hépatite chronique à la cirrhose et parfois jusqu'au carcinome hépatocellulaire ont été observés
- 75% des infections par le virus NANB entraînent une infection persistante
- Le virus NANB est plus fréquemment observé en Occident

Le virus NANB a été identifié et caractérisé en 1989 (Choo et al., 1989) et a été nommé virus de l'hépatite C (VHC). Le séquençage du génome du VHC a permis de rapidement classer ce virus dans la famille des *Flaviviridae*.

I.2 Le VHC

Le VHC appartient à la famille des *Flaviviridae* (Figure 1), qui est divisé en 4 genres : (1) tout d'abord le genre *Flavivirus* composé entre autre du virus de l'encéphalite japonaise, du virus du West Nile, du virus de la dengue, du virus Zika et du virus de la fièvre jaune ; (2) le genre *Pestivirus* comprenant, entre autres, le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) et le virus de la fièvre porcine ; (3) le genre *Pegivirus* comprenant le virus GB de type C renommé le virus HPg et le virus GB de type A renommé SPg (Scheel et al., 2015). Le dernier genre (4) *Hepacivirus* est constitué entre autres du VHC et du virus GBV de type B.

Les virus regroupés dans la famille des *Flaviviridae* ont une organisation génomique similaire. Ce sont des virus ayant un diamètre compris entre 40 et 60 nm recouvert par une enveloppe lipidique. Leur génome est un ARN simple brin de polarité positive compris entre 9 à 13 Kilobase (Kb) protégé par une capsid. L'ARN génomique est traduit dans le cytoplasme des hépatocytes en une polyprotéine servant de précurseur aux protéines structurales et non structurales nécessaires à la formation de nouveaux virions (*International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV*).

Le VHC infecte exclusivement l'Homme, et de manière prédominante les cellules du foie. On retrouve dans le monde 7 génotypes différents du VHC, numérotés de 1 à 7, ainsi que de 67 sous-types (Smith et al., 2014). Le VHC (Figure 2) est un virus enveloppé d'un diamètre moyen de 60 nm (Catanese et al., 2013 ; Piver et al., 2016). Une nucléocapside protège le génome viral. Cette nucléocapside est elle-même enveloppée par une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines virales d'enveloppe E1 et E2. L'enveloppe virale est également recouverte de manière asymétrique par des apolipoprotéines. La densité des particules virales est un élément essentiel qui influence leur infectiosité : elle peut varier entre 1,03 et 1,20 g/cm³ (Pumeechockchai et al., 2002). En effet, les particules virales sont plus infectieuses quand leur densité est faible (Vieyres et al., 2010). La variation de densité des particules virales est due à leur association aux lipoprotéines durant leur sécrétion via la voie de

biosynthèse des lipoprotéines de très faible densité (VLDL : « *Very Low Density Lipoprotein* »). Dans ces conditions, on peut alors parler de lipoviroparticules (Nielsen et al., 2006 ; Catanese et al., 2013). Il est également proposé dans la littérature que deux types de virions pourraient coexister chez les individus infectés : en effet, il a été observé en microscopie électronique que les lipoprotéines peuvent s'organiser soit de manière asymétrique autour de la particule virale sous forme d'association périphérique, soit associées sous forme d'inclusion dans la bicouche lipidique (Lindenbach et al., 2013). Récemment, une stratégie basée sur l'immunocapture directe de particules virales visualisé en microscopie électronique à transmission a été développée. Cette nouvelle stratégie ouvre de nouvelles possibilités d'approfondir notre connaissance sur l'organisation morphologique précise des particules virales (Piver et al., 2016).

I.3 La polyprotéine du VHC

Le génome du VHC est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive ayant une taille d'environ 9,6 Kb. Cet ARN simple brin est composé d'une région 5' non traduite (UTR : *Untranslated Transcribed Region*) incluant le site de fixation des ribosomes appelé IRES (IRES : *Internal Ribosome Entry Site*) (Brown et al., 1992), d'un seul cadre ouvert de lecture (ORF : *Open Reading Frame*) codant pour une polyprotéine d'environ 3000 aa et d'une région 3'UTR.

I.3.a La région 5' non codante

La région 5' non codante ou 5'UTR (Figure 3A) a une longueur d'environ 341 nucléotides (nt). Cette région est conservée à 90% entre les différents génotypes notamment les structures secondaires et tertiaires (Bukh et al., 1992; Brown et al., 1992; Bukh et al., 2012). Cette région est impliquée dans la réplication et la traduction de l'ARN viral (Friebe et al., 2001). La région 5'UTR est constituée de 4 domaines, le domaine I ayant une longueur de 40 nt et les domaines II à IV constituant le site de fixation des ribosomes. Les éléments indispensables à l'initiation de la traduction sont recrutés au niveau de l'IRES. Ce domaine permet aussi de réguler la traduction de l'ORF

en absence de coiffe (Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Les domaines II et III sont plus complexes que le domaine IV (Honda et al., 1999). La base du domaine III est hautement conservée et très importante pour le recrutement et la fixation de la sous unité ribosomale 40S sur l'ARN (Wang et al., 1995). Alors que la tige-boucle du domaine IV n'est pas requise pour la fixation des ribosomes. La stabilité de ce domaine est négativement corrélée à l'efficacité de traduction de l'ARN viral (Honda et al., 1996).

I.3.b La région 3' non codante

La région 3' non codante ou 3'UTR (Figure 3B) est importante lors de la réplication virale car elle fixe le complexe de polymérisation comprenant l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp : *RNA-dependent RNA polymerase*). L'interaction directe de la région 3'UTR avec la machinerie traductionnelle facilite efficacement la traduction (Shi et al., 2016). Cette région varie entre 200 et 235 nt et contient trois régions différentes (Figure 3). Tout d'abord une petite région variable qui suit immédiatement le codon de terminaison de la polyprotéine d'une longueur variant entre 27 et 70 nt (Kolykhalov et al., 1997a). La région 3'UTR ne contient pas de queue poly A mais est suivie d'une région poly (U/UC) ayant une longueur d'environ 80 nt régulant la réplication. Enfin une dernière région conservée de 98 nt, nommé 3'X, termine la région 3' UTR de l'ARN du VHC. La petite région variable, la région poly (U/UC) et la région 3'X permettent d'amplifier de manière significative la traduction virale (Song et al., 2006).

I.3.c Clivage de la polyprotéine

L'ARN viral est traduit en une polyprotéine unique. Le clivage de cette polyprotéine virale a lieu au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et est réalisé à l'aide du recrutement de multiples protéines cellulaires. Ce clivage permet la libération et la maturation de dix protéines virales (Figure 4). Les protéines virales peuvent être classées en deux groupes : d'une part les protéines structurales nécessaires à la formation des nouveaux virions, correspondant à la protéine core, aux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et à la protéine P7, et, d'autre part, les protéines non structurales impliquées dans la réplication du virus incluant la protéase NS2, le complexe NS3-4A ayant une activité protéasique et ARN hélicase/NTPase, et les protéines NS4B, NS5A et

A/

B/

Les paramètres nécessaires sont manquants ou erronés. Les paramètres nécessaires sont manquants ou erronés. Les paramètres nécessaires sont manquants ou erronés.

Figure 3: Représentation des régions 5'UTR et 3'UTR de l'ARN viral du VHC. A Région 5' UTR du VHC où sont schématisés et annotés les domaines I à IV. B Région 3'UTR où sont annotés la région 3'X et poly (U/UC).

NS5B correspondant à la RdRp. Cependant certaines protéines nécessaires à la réplication peuvent également être impliquées dans d'autres étapes du cycle viral, comme NS5A qui intervient lors de l'assemblage des virions.

Les différentes protéines structurales et non structurales sont clivées à partir de la polyprotéine selon un ordre bien précis (Pietschmann et al., 2001). Via une première signal peptidase, les protéines structurales et le polypeptide P7 sont clivés à partir de la

polyprotéine au niveau du RE, puis maturés. Il en résulte la libération des protéines core, E1, E2 et P7. L'autoprotéase NS2-NS3, possédant une activité protéase à cystéine, permet ensuite le clivage de la jonction entre NS2-NS3. Puis la protéase virale à sérine NS3-4A permet la libération de la protéine NS3. Cette dernière protéase virale clive la polyprotéine au niveau de la jonction entre NS5A et NS5B produisant alors une protéine intermédiaire NS4A-4B-5A. Le clivage entre NS4A et NS4B permet la production d'un précurseur assez stable NS4B-NS5A. Enfin, la coupure entre NS4B et NS5A a lieu (Herod et al., 2012). La protéine core est ensuite retrouvée à proximité des gouttelettes lipidiques, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont ancrées dans la membrane du RE tandis que les protéines non structurales, à l'exception de NS2, forment le complexe de réplication au niveau de la membrane du RE (Suzuki et al., 2007).

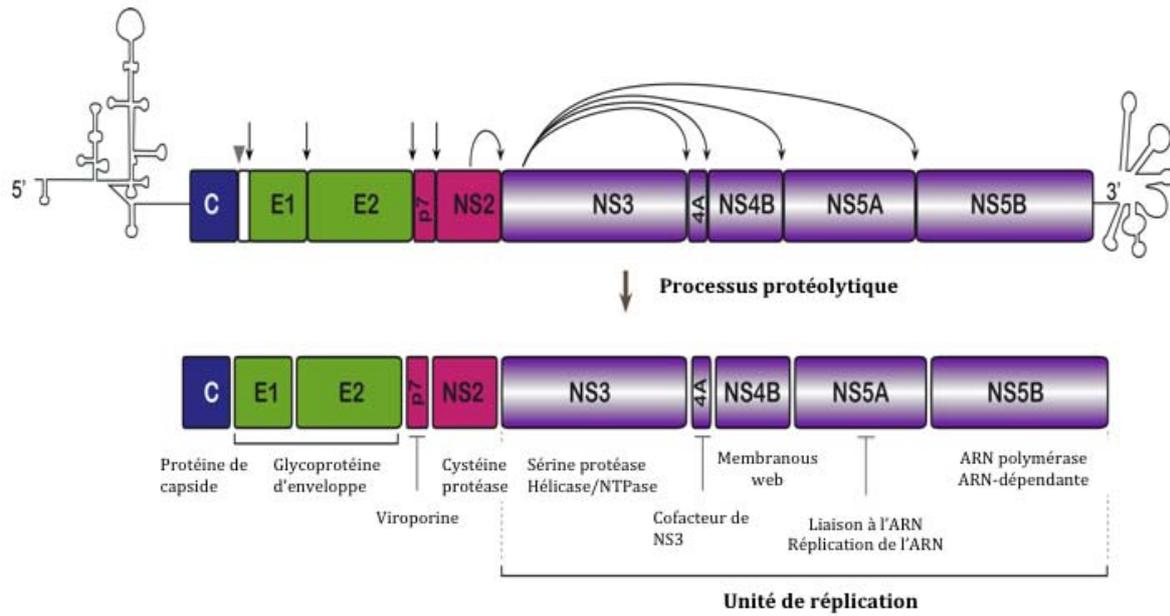
I.3.d Les protéines structurales

Les protéines structurales du VHC regroupent la protéine core et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.

I.3.d.i Core

La première protéine structurale codée par l'ORF du VHC est la protéine de capsid appelée aussi protéine core. Cette protéine forme la nucléocapsid du VHC nécessaire à la protection du génome viral (Figure 5). Cette protéine est libérée de son précurseur par deux protéases cellulaires. Un premier signal peptidase cellulaire clive la jonction core-E1 permettant de libérer une forme immature de la protéine core (191 acides aminés (aa) et 23 KDa) dans la lumière du RE. Le second peptide signal (SPP) est

A/



B/

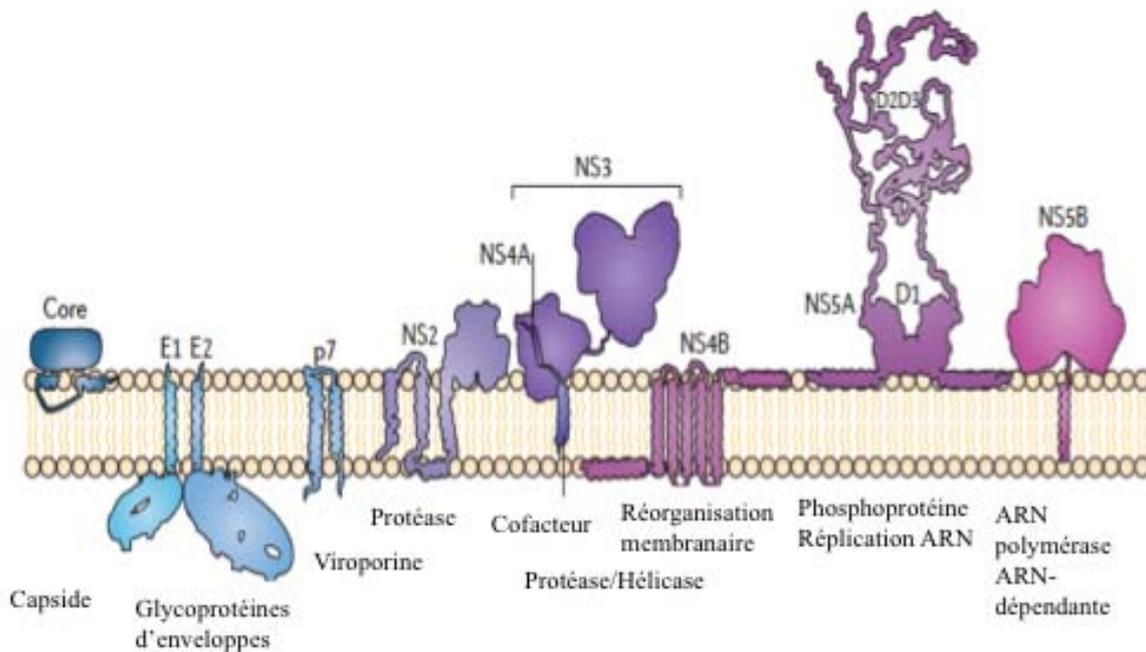


Figure 4: Clivage de la polyprotéine du VHC. A/ Représentation de l'ARN viral avec la polyprotéine encadrée par les régions 3' et 5' UTR. Les flèches noires pointent les endroits où la polyprotéine est clivée. Les protéines core-E1-E2 et P7 sont clivées à partir de la polyprotéine par une première protéase cellulaire. Puis l'autoprotéase NS2/NS3 clive la jonction entre NS2-NS3. Puis la protéase à sérine clive le reste de la polyprotéine. En violet sont représentées les protéines non-structurales du VHC nécessaires à la réplique. B/ Structure schématique des différentes protéines structurales et non structurales ancrées dans la membrane du RE (d'après Bartenschlager et al., 2013)

clivé par une autre protéase cellulaire, permettant de libérer une forme mature de la protéine (177 aa et de 21 KDa) (McLauchlan et al., 2002; Oehler et al., 2012; Okamoto et al., 2008; Pène et al., 2009; Santolini et al., 1994). Seule la protéine core mature permet de produire des particules virales infectieuses (Targett-Adams et al., 2008).

La protéine core mature est une protéine dimérique membranaire, stabilisée par un pont disulfure entre les cystéines 128. Cette protéine, composée de deux domaines distincts, est essentiellement formée d'hélice α (50%) (Boulant et al., 2005; Kushima et al., 2010). Le domaine 1 est situé en N-terminal (aa 1 à 117). Ce domaine à la structure flexible contient une forte proportion de résidus basiques, le rendant principalement hydrophobe. Ce domaine est essentiel pour la liaison de la protéine core à l'ARN viral et permet également de réguler la traduction des autres protéines virales (Boni et al., 2005; Lourenco et al., 2008; Shimoike et al., 2006). Le domaine 2, situé en C-terminal, (aa 118-177) est constitué d'un domaine central hydrophobe connecté à deux hélices amphipathiques (Boulant et al., 2005). Il contribue à l'interaction de la protéine core avec les lipides, les gouttelettes lipidiques et la membrane du RE (Boulant, 2006).

Il a été montré que la protéine core interagissait avec les protéines non structurales NS2 et NS3-4A du VHC (Coller et al., 2009; Counihan et al., 2011). L'association de la protéine core avec les gouttelettes lipidiques et son interaction avec la protéine NS5A a un rôle central lors de l'assemblage de la nucléocapside (Miyanari et al., 2007). La protéine NS5A associée aux gouttelettes lipidiques, permet de transférer l'ARN viral au niveau de la protéine core qui va s'y lier (Cristofari et al., 2004; Santolini et al., 1994). L'association de core aux gouttelettes lipidiques est également essentielle pour le recrutement des autres protéines virales lors de l'assemblage des virions (Popescu et al., 2014). En effet, cette protéine interfère avec l'expression de différents gènes cellulaires mais aussi avec le métabolisme des lipides (Shrivastava et al., 1998 ; Alsaleh et al., 2010 ; Afzal et al., 2014).

I.3.d.ii La protéine F

Un décalage du cadre de lecture (-2/+1) peut se produire lors de la traduction de la protéine core au niveau des 11 premiers résidus, générant une protéine ARF (ARF :

Les paramètres nécessaires sont manquants ou erronés.

Figure 5: Représentation schématique de la protéine core. Le domaine 1 (aa 1 à 122) est nécessaire pour la liaison à l'ARN tandis que le domaine 2, (aa 122 à 174) est nécessaire pour l'association de la protéine core à la membrane et aux gouttelettes lipidiques (d'après (Kao et al., 2016))

Alternative Reading Frame Protein) (Fishman et al., 2009; Walewski et al., 2001). La taille de cette protéine varie entre 8 et 14 KDa (Eng et al., 2009). ARF est située au niveau des membranes périnucléaires du RE et est très instable, comme le montre sa demi-vie d'environ 10 min (Roussel et al., 2003).

Des anticorps anti-ARF ont été détectés chez les patients infectés par le VHC (Karamitros et al., 2012; Xu et al., 2001). Dans les cellules en culture et chez le chimpanzé, la protéine ARF n'est pas indispensable à la réplication du VHC. Les différents rôles de cette protéine sont complexes et partiellement compris. Certaines des activités de cette protéine sont redondantes avec celles de la protéine core (Kotta-Loizou et al., 2013). L'insertion de mutations silencieuses dans ARF puis l'inoculation du virus mutant chez le chimpanzé ont permis de montrer d'une part, une réduction de la production de virion, et d'autre part, l'apparition de pathologies hépatiques (McMullan et al., 2007).

I.3.d.iii Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 ont un rôle central à différentes étapes du cycle viral du VHC, incluant l'étape de liaison du virus aux facteurs cellulaires d'entrée, la fusion entre l'enveloppe virale avec la membrane endosomale, et l'étape d'assemblage des particules virales.

E1 (35 KDa) et E2 (70 KDa) sont des protéines transmembranaires de type I composées d'un grand ectodomaine en N-terminal (160 et 360 aa respectivement pour E1 et E2) et d'un domaine C-terminal plus court (environ 30 aa). Les ectodomains de E1 et E2 sont fortement glycosylés et dirigés vers la lumière du RE (Rouillé et al., 2006). Les deux domaines transmembranaires (TMD) sont principalement hydrophobes et sont séparés par un petit fragment polaire composé de résidus chargés (Cocquerel et al., 2000). Les TMDs de ces deux protéines ont deux fonctions, ils permettent d'une part d'ancrer les protéines dans la membrane du RE et d'autre part ils sont essentiels à l'hétérodimérisation des protéines.

Le processus de maturation de E1 et E2 est complexe. Le précurseur des glycoprotéines d'enveloppe est d'abord clivé par une peptidase cellulaire dans la lumière du RE (Penin et al., 2004). Les TMDs forment une structure en épingle à cheveux avant que la séquence signal de E1 et E2 ne soit clivée. Après le clivage du peptide signal, la protéine est réorientée vers le cytosol, formant ainsi un passage transmembranaire (Cocquerel et al., 2002). Durant leurs synthèses, les ectodomains de E1 et E2 sont

transloqués dans la lumière du RE et les TMDs sont insérés dans la membrane du RE. Puis E1 et E2 sont fortement modifiées post-traductionnellement avec l'ajout de N-glycosylation, O-glycosylation et de ponts disulfure. Les ponts disulfure permettent à E1 et E2 de former des complexes covalents stables lors de l'assemblage des virions (Vieyres et al., 2010; 2014), alors que les formes intracellulaires *in vitro* de E1 et E2 forment des complexes non covalents (Voisset and Dubuisson, 2004). Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 contiennent respectivement 6 et 11 sites de N-glycosylation. Les N-glycosylation sont impliquées dans l'assemblage des particules virales et ont un rôle important lors de l'infection du VHC. Certaines N-glycosylations (E2N1, E2N2, E2N4, E2N6, et E2N11) sur E2 participent également à l'échappement immunitaire du VHC en réduisant la sensibilité des particules virales aux anticorps neutralisant (Helle et al., 2010). La présence de ponts disulfure entre les glycoprotéines d'enveloppe suggère que l'interaction protéine-protéine a un rôle important lors du bourgeonnement des particules virales. En effet, la maturation et le repliement du complexe E1-E2 sont dépendants d'un processus impliquant les protéines chaperonnes, principalement la calnexine (Dubuisson and Rice, 1996), et de la formation de ponts disulfure aussi bien que des glycosylations (Moradpour and Penin, 2013; Wahid et al., 2013).

Les gènes codant pour les glycoprotéines sont particulièrement variables et plusieurs régions à hypervariabilité génétique (HVR) ont été identifiées pour E2, pouvant différer jusqu'à 80% selon les génotypes (Figure 6). La glycoprotéine d'enveloppe E2 contient 3 régions hypervariables, les régions HVR1, HVR2 et une région variable intergénomique (igVR). La région HVR1, comprenant 27 aa, se trouve dans une région immunodominante. Elle permet notamment de lier le récepteur Scavenger de classe B de type I (SR-BI) (Callens et al., 2005). La délétion de cette région réduit l'infectiosité des particules virales (Prentoe et al., 2011). Malgré la haute variabilité de cette région, des résidus basiques chargés sont présents à des positions fixes, permettant de conserver les propriétés intrinsèques de cette région (Penin et al., 2001). Cette région est donc une cible intéressante pour la mise au point d'anticorps neutralisants.

La région HVR2 (aa 91-97) montre 100% de diversité entre les différents génotypes du VHC. Le domaine igVR (aa 187-197) varie de manière importante entre les génotypes. Ces deux régions sont moins bien caractérisées que HVR1, cependant il a pu

être mis en évidence qu'elles étaient impliquées dans la formation des hétérodimères et qu'elles intervenaient aussi lors de la liaison de E2 aux différents récepteurs d'entrée (Albecka et al., 2011, McCaffrey et al., 2011). Les régions hypervariables HVR1, HVR2 et igVR ont un rôle essentiel lors de l'échappement du virus au système immunitaire. Ces régions sont également essentielles pour l'intégrité structurale et la fonction des glycoprotéines d'enveloppe du VHC (McCaffrey et al., 2011).

Deux modèles de cristallisation ont été réalisés cette dernière décennie. Ils ont permis entre autre de déterminer si E2 était une protéine de fusion ou non. En effet le mécanisme de fusion virale est déterminant lors de l'infection du VHC. Dans un premier temps, il avait été émis comme hypothèse que E2 était la protéine de fusion du VHC. Partant de ce postulat, le premier modèle de cristallographie a été réalisé. Ce modèle repose sur le fait que les structures secondaires et tertiaires des protéines d'enveloppe sont supposées être similaires à celles des autres protéines de la famille des *Flaviviridae*. Ceci permet de suggérer que les protéines E1 et E2 appartiendraient aux protéines de fusion de classe II. Le modèle de cristallisation de E2 publié par Thomas Krey et ses collaborateurs en 2010 (Krey et al., 2010) comprend trois grands domaines. Tout d'abord un domaine 1 (D1) contenant 8 feuillets β qui s'étendent de la partie N-terminale jusqu'à la région hypervariable 1 (HVR1) qui comprend la majorité des déterminants interagissant avec CD81. Le domaine 2 (D2), incluant HVR2, et la partie la plus conservée de la glycoprotéine : une hélice de fusion (aa 119-137). Le domaine D1 est relié au domaine 3 (D3) par une région variable intergénomique. D3 inclus la région interagissant avec CD81 tout en étant connecté au TMD. La structure conformationnelle de cette protéine change en fonction de ses interactions spécifiques avec différents partenaires biologiques (Krey et al., 2010).

Les paramètres nécessaires sont manquants ou erronés.

Figure 6: Représentation des différentes régions hypervariables de E2. Les trois régions hypervariables HVR1, HVR2 et igVR sont représentées ci-dessus (D'après (Khan et al., 2014))

Cependant ce modèle s'est avéré par la suite inexact. En effet, la structure tridimensionnelle de l'ectodomaine de E2 a été déterminée par deux autres équipes : Kong et ses collaborateurs en 2013 et Khan et ses collaborateurs en 2014 (Khan et al., 2014; Kong et al., 2013). Ces derniers modèles mettent en avant que E2 n'est pas une protéine de fusion de classe II car cette protéine présente une structure compacte globulaire et se replie de façon similaire à l'IgG. Le cœur de E2 est principalement

constitué de brins β et d'une boucle formée de deux petites hélices α . Les brins sont disposés en deux feuillets perpendiculaires (A et B) qui sont maintenus ensemble par un cœur hydrophobe et de nombreux feuillets β . Ce modèle permet de suggérer que E2 n'est pas une protéine de fusion, mais que soit E1 seule soit E1 en interaction avec E2 pourraient catalyser le processus de fusion (Khan et al., 2014; Kong et al., 2013) nécessaire à l'infection du VHC.

I.3.e Les protéines non structurales

Les protéines non structurales comprennent P7, NS2, NS3, NS4A, NS5A et la RdRp NS5B. La protéine NS3 va tout d'abord s'associer avec la protéine NS2 pour former l'autoprotéase NS2/NS3. Dans un second temps NS3 va s'associer à la protéine NS4A pour former la protéase NS3/4A. Ces deux autoprotéases permettent la libération et la maturation de l'ensemble des protéines non-structurales.

I.3.e.i La protéine P7

La protéine P7 est une protéine membranaire de 63 aa majoritairement hydrophobe. Cette protéine est constituée de deux hélices α transmembranaires, connectées entre elles par un fragment hydrophile chargé positivement. Ses domaines N et C terminaux sont orientés vers la lumière du RE (Carrere-Kremer et al., 2002). Cette protéine, s'associant en hexamères ou heptamères, forme des canaux à cations facilitant la production virale. Ces propriétés sont importantes lors des étapes de maturation intracellulaire des virions (essentielle à leur sécrétion) et permettent d'associer cette protéine à la famille des viroporines (Chandler et al., 2012; Clarke et al., 2006; Luik et al., 2009). Cette protéine peut également être associée aux protéines d'enveloppe et à NS2, permettant ainsi de participer à la coordination de l'assemblage des particules virales (Madan and Bartenschlager, 2015). La protéine P7 n'est pas requise pour la réplication de l'ARN *in vitro* mais est essentielle pour l'assemblage et la sécrétion des particules infectieuses (Steinmann and Pietschmann, 2010). Cependant, le rôle précis de la protéine P7 lors de la sécrétion des virions n'est pas encore élucidé.

I.3.e.ii NS2

La protéine NS2 (23Kda et 217 aa) est majoritairement hydrophobe. Les résidus ayant une activité catalytique se situent en C-terminal dans une triade formée par les aa suivant : l'histidine 143, la glycine 163 et la cystéine 184. Alors qu'en N-terminal est présent le domaine membranaire constitué de trois fragments transmembranaires (Jirasko et al., 2008, 2010). La structure cristallographique de NS2 montre un dimère composé de deux sites actifs (Lorenz et al., 2006; Assenberg et al., 2009).

L'association de NS2 avec le domaine N-terminal de NS3, permet la formation de l'autoprotéase NS2/NS3. Le clivage de la polyprotéine entre NS2/NS3 est réalisé par la protéase à cystéine codée par NS2. La protéase NS2 est indispensable pour la réplication de l'ARN et le clivage NS2/NS3 est essentiel pour la libération de la fonctionnalité de la protéine NS3, permettant aussi la réplication de l'ARN viral (Jirasko et al., 2008; Schregel et al., 2009). NS2 a un rôle central dans l'assemblage des particules infectieuses du VHC, indépendamment de son activité protéasique. Cette protéine favorise également un réseau complexe d'interaction entre les protéines structurales et non structurales, aboutissant à l'assemblage des nouveaux virons (Jirasko et al., 2010; Popescu et al., 2011; Selby et al., 1994).

I.3.e.iii Le complexe NS3-4A

Le complexe NS3-4A est un complexe non covalent constitué de la protéine NS3 et du cofacteur NS4A (Figure 7).

NS3 est une protéine multifonctionnelle de 70 KDa ayant une activité sérine protéase en N-terminal (entre les aa 1 et 180) et une activité NTPase/ARN hélicase en C-terminal. Ces deux activités enzymatiques ont été bien définies (Aydin et al., 2013; McGivern et al., 2015; Morikawa et al., 2011; Yao et al., 1999). L'activité NTPase/ARN hélicase permet d'éliminer la formation de structures secondaires temporaires de l'ARN (Murray et al., 2008). Le site catalytique de NS3-4A forme une triade avec les aa suivants : l'histidine 57, l'acide aspartique 81 et la sérine 139 (Meeprasert et al., 2014; Moradpour and Penin, 2013). L'activité NS3 hélicase est essentielle pour la réplication de l'ARN et est impliquée dans l'assemblage des virions.

Le polypeptide NS4A (54 aa et 6 KDa) est le cofacteur de NS3 (Schregel et al., 2009). La protéine NS3 ne possède pas de fragment transmembranaire, cependant la portion N-terminale de NS4A, principalement hydrophobe (de l'aa 1 à 21), forme une hélice α transmembranaire requise pour l'association intégrale du complexe NS3-NS4A à la membrane du RE (Brass et al., 2008). La partie C-terminale de NS4A est chargée négativement et interagit avec d'autres composés contribuant également directement à la réplication de l'ARN et à l'assemblage des nouveaux virions (Lindenbach et al., 2007; Kohlway et al., 2014).

De façon intéressante, le complexe NS3-4A est localisé non seulement au niveau des membranes du RE, à proximité du complexe de réplication, mais il est aussi associé de façon minoritaire à la membrane des mitochondries (Horner et al., 2011; Wölk et al., 2000). La protéine NS3-4A a un rôle essentiel car elle permet le clivage et la libération des protéines non-structurales de la polyprotéine. Cette protéine interagit aussi avec des protéines cruciales nécessaires à la mise en place d'une réponse immunitaire innée chez l'hôte comme le TLR3 adaptateur de TRIF (qui est immunomodulateur des facteurs de croissance). Ceci montre que NS3-4A est essentiel non seulement lors de la réplication mais aussi lors de la persistance et de la pathogénèse du VHC (Li et al., 2005).

I.3.e.iv NS4B

NS4B est une protéine hydrophobe (261 aa, 27 KDa) (Figure 8), intégrée dans la membrane du RE (Gouttenoire et al., 2010). Cette protéine est formée de plusieurs domaines. Tout d'abord un premier domaine en N-terminal (de l'aa 1 à 69), suivi d'un domaine central formé de 4 passages transmembranaires (de l'aa 70 à 190) puis d'un domaine C-terminal (de l'aa 191 à 261). La région N-terminale comprend deux hélices α amphipathiques, nommées AH1 (aa 3 à 35) et AH2 (aa 42 à 66) (Lundin et al., 2003). La

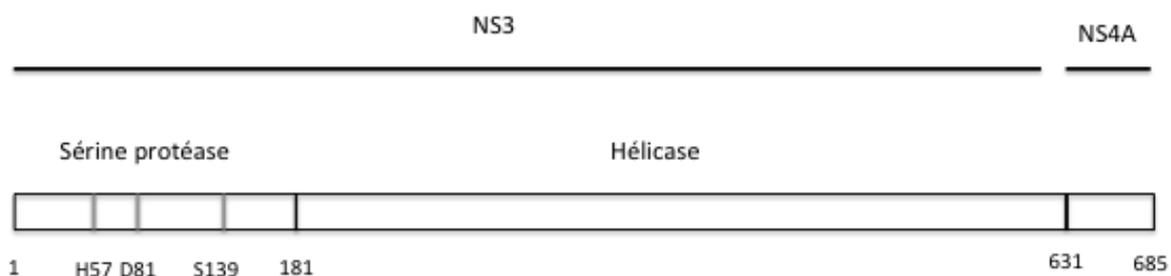


Figure 7: Représentation schématique des protéines NS3-4A. Annotation du domaine sérine protéase (aa 1 à 181) et du domaine ARN hélicase (181 à 631) de NS3. Les sites actifs de la sérine protéase sont représentés par des traits annotés H57, D81 et S139. Le cofacteur NS4A est représenté allant de l'aa 631 à 685.

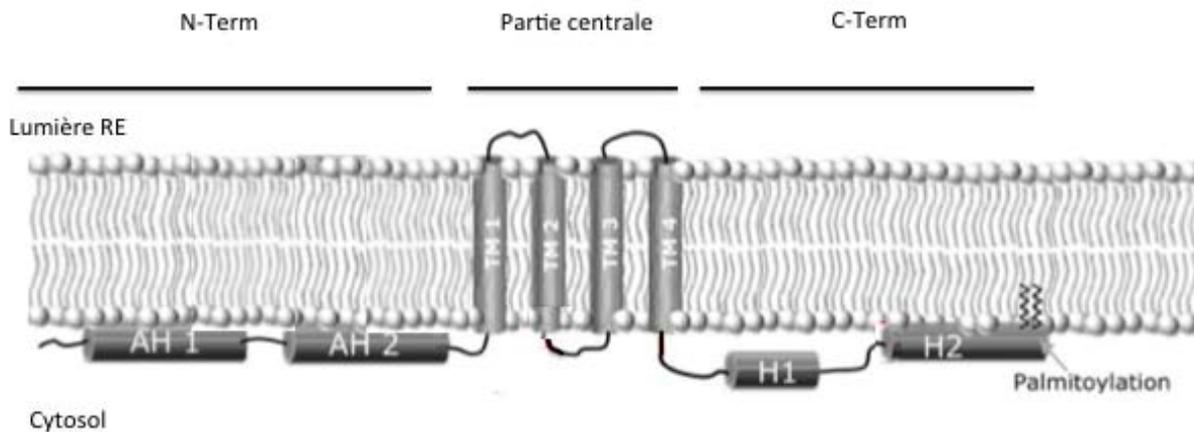


Figure 8: Représentation schématique de la protéine NS4B. La protéine NS4B est formée de 3 domaines: (1) un domaine en N-terminal, (2) une partie centrale (3) et un domaine en C-terminal. Le domaine N-terminal est constitué de deux hélices α amphipathiques (AH1 et AH2). La partie centrale est constituée de 4 passages transmembranaires, tandis que la portion C-terminale est composée de deux hélices α amphipathiques (H1 et H2).



Figure 9: Représentation schématique de la phosphoprotéine NS5A NS5A est composée de 3 domaines: le domaine 1 (aa 36 à 213), le domaine 2 (250 à 342) et le domaine 3 (356 à 447). Les deux séquences LCS sont également représentées (D'après (Kumthip and Maneekarn, 2015).

partie N-terminale de NS4B peut se retrouver réduite par la co-expression d'autres protéines non structurales, particulièrement de NS5A (Gouttenoire et al., 2009 ; Lundin et al., 2006). Ces observations montrent que la topologie membranaire de la partie N-terminale de NS4B peut être dynamique et modulée par l'interaction protéine-protéine dans le complexe de réplication (Gouttenoire et al., 2009b). La partie C-terminale de

NS4B est hautement conservée avec une première hélice α amphipathique (H1 aa 201-213), et une seconde hélice α amphipathique (H2 aa 229-253) associée à la membrane (Gouttenoire et al., 2009b; Palomares-Jerez et al., 2012). L'association à la membrane de la protéine est assurée non seulement par les portions transmembranaires situées dans la partie centrale, mais aussi par des déterminants associés à la membrane en N et C terminal (possible palmitoylation, AH2, H2) (Yu et al., 2006).

NS4B induit la formation d'un réseau membranaire complexe appelé « membranous web ». Le « membranous web » est défini comme une altération spécifique des membranes du RE, localement confinées en vésicules permettant l'ancrage du complexe de réplication (Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003). NS4B lie également l'ARN viral (Einav et al., 2008), et est impliquée dans l'assemblage et la sécrétion des particules virales (Jones et al., 2009). Les différentes fonctionnalités de NS4B peuvent être dues aux différentes topologies que peut prendre cette protéine, mais également à l'interaction de cette protéine avec les autres protéines aussi bien cellulaires que virales. De façon similaire aux autres protéines non structurales, des formes oligomères de NS4B ont été rapportées, dont des trimères (Yu et al., 2006). Ces oligomérisations sont importantes car leur absence perturbe la formation des « membranous web » et la réplication de l'ARN viral (Gouttenoire et al., 2010). Obtenir une structure cristallographique de NS4B permettrait d'avoir une idée plus précise des multiples fonctions de cette protéine.

I.3.e.v NS5A

NS5A est une phosphoprotéine (447 aa, 56 KDa) (Figure 9) constituée d'une hélice α amphipathique transmembranaire située en N-terminal (Penin et al., 2004) et de trois domaines. Le domaine 1 (aa 36-213), interagissant avec les gouttelettes lipidiques (Miyanari et al., 2007), et le domaine 2 (aa 250-342) contribuent à la réplication de l'ARN. Le domaine 3 (aa 356-447), essentiel à l'assemblage viral, interagit avec la protéine core (Appel et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008a; Masaki et al., 2008). Ces différents domaines sont séparés par deux séquences dites de faible complexité (LCS : « *Low Complexity Sequences* ») (Tellinghuisen et al., 2004). La protéine NS5A se trouve soit sous forme phosphorylée de façon basale (56 KDa) soit sous forme hyper

phosphorylée (58 KDa) sur certaines sérines présentes dans le domaine LCS1 (Evans et al., 2004). La phosphorylation de NS5A entraîne la modulation de la réplication du VHC, probablement par l'intermédiaire de la régulation des interactions avec les facteurs spécifiques impliqués dans l'assemblage (Neddermann et al., 2004; Tellinghuisen et al., 2008b).

NS5A est associée à la membrane du RE et joue un rôle important lors de la réplication de l'ARN et la formation des particules virales. Cette protéine est associée à une monocouche de phospholipides lui permettant d'interagir avec la protéine core au niveau des gouttelettes lipidiques (Tellinghuisen et al., 2005). Il est suggéré que NS5A forme de multiples dimères plus particulièrement avec le domaine 1 (Hwang et al., 2010). Tandis que les domaines D2 (Liang et al., 2007) et D3 (Hanouille et al., 2009a) ne participent pas à la formation des dimères. Les dimères de NS5A sont nécessaires à la formation d'un passage au niveau de la membrane du RE en faisant glisser l'ARN sur la membrane du RE et ainsi permettant la coordination des différents acteurs de la réplication (Moradpour et al., 2005). La conformation en dimère est stabilisée par l'interaction spécifique avec des protéines de l'hôte ou virales avec lesquelles la protéine NS5A interagit (Hanouille et al., 2009b).

I.3.e.vi NS5B

La première étape de la réplication du VHC consiste à synthétiser de l'ARN simple brin de polarité négative complémentaire au génome, puis, dans un second temps, de l'ARN simple brin de polarité positive à partir de l'ARN simple brin de polarité négative. Ceci est effectué à l'aide de la RdRp NS5B (Figure 10). Cette enzyme virale est composée de 591 aa et fait 68 kDa (Behrens et al., 1996; Lesburg et al., 1999; Lohmann et al., 1997). Le domaine catalytique de NS5B est formé d'un domaine N-terminal (530 aa), et de trois sous-domaines couramment retrouvés chez les polymérases RdRp. Ces trois sous-domaines sont représentés sous forme imagée par une main droite composée « des doigts », de « la paume » et « d'un pouce » (Figure 10). Cette analogie est basée sur la description initiale de la structure de l'ADN polymérase Klenow (Ollis et al., 1985).

Deux acides aspartiques (Asp 220 et Asp 318) situés dans la « paume » forment un complexe catalytique responsable de la réaction de polymérisation. La matrice d'ARN

simple brin ou double brin passe dans la rainure entre « les doigts » et « le pouce » menant directement au site actif et permettant ainsi la réaction de polymérisation. L'accès aux NTPs se fait via un tunnel commençant en périphérie et s'étendant jusqu'au site actif situé dans « la paume ».

L'intégralité du fragment C-terminal (21aa) de NS5B est associée à la membrane : cette liaison résulte de l'orientation du domaine catalytique vers le cytosol (Schmidt-Mende et al., 2001). L'ancrage de NS5B n'est pas nécessaire à l'activité polymérase *in vitro* mais est indispensable à la réplication de l'ARN dans les cellules (Moradpour et al., 2004). Le modèle moléculaire de NS5B, associé à la membrane, suggère que la liaison de la protéine à l'ARN a lieu à l'interface avec la membrane. Cette forme inactive de la RdRp peut être activée par un changement conformationnel permettant de relier le domaine catalytique et le segment transmembranaire en C-terminal. Ce changement libère le passage permettant à l'ARN d'accéder au site catalytique le faisant pivoter près de la membrane (Penin et al., 2004).

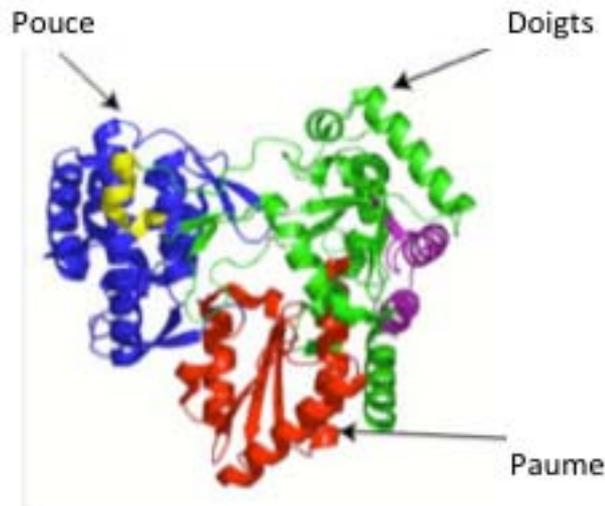


Figure 10: Schématisation de la protéine NS5B sous forme de « main droite ». En bleu foncé et jaune sont représentés le pouce, en vert et violet les doigts, et en rouge la paume (D'après (Ferron et al., 2005)).

I.4 Le cycle viral du VHC

Le cycle d'infection et de propagation du VHC (Figure 11) se découpe en trois grandes étapes. Une première étape d'entrée au cours de laquelle le virus pénètre dans

les cellules hépatocytaires, suivie de l'étape de réplication et enfin de l'étape d'assemblage et de sécrétion des nouveaux virions.

I.4.a Entrée du VHC dans les cellules hépatocytaires

Après l'infection d'un individu par le VHC, les particules virales sont transportées par le sang jusqu'aux hépatocytes. Une première capture des particules virales a lieu par l'intermédiaire de facteurs d'attachement présents à la surface cellulaire. Ces facteurs d'attachement sont les lectines DC-SIGN (« *Dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3- grabbing nonintegrin* ») et L-SIGN (« *liver/lymph node-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin* »), des protéoglycanes de type héparane sulfate (HSPG), et le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL-r).

I.4.a.i Les facteurs d'attachement

I.4.a.i.1 Les lectines de type C

Les protéines DC-SIGN et L-SIGN sont des protéines membranaires de type II appartenant à la famille des lectines C. Ces deux protéines ne sont pas exprimées à la surface des hépatocytes. La protéine DC-SIGN est exprimée à la surface des macrophages spécifiques du foie, des cellules de Kupffer, ainsi qu'à la surface des cellules endothéliales sinusoidales hépatiques. La protéine L-SIGN est quant à elle uniquement exprimée à la surface des cellules endothéliales sinusoidales du foie (Pohlmann et al., 2003). Certains motifs moléculaires viraux de la glycoprotéine d'enveloppe E2 sont reconnus par ces lectines, il s'agit des oligosaccharides de mannose des glycoprotéines. Les particules virales circulantes chez les patients se lient à ces deux protéines (Cormier et al., 2004; Gardner et al., 2003; Lozach et al., 2003, 2004). Ce sont les premiers facteurs qui capturent les particules virales dans le sang, permettant le rapprochement du VHC des hépatocytes (Cormier et al., 2004; Feng et al., 2004).

Les particules virales captées par les lectines DC-SIGN et L-SIGN se retrouvent alors à proximité des hépatocytes où d'autres facteurs d'attachements plus spécifiques vont pouvoir les capturer.

I.4.a.i.2 Les HSPG

Les glycosaminoglycanes (GAGs) font partie d'une large famille de polysaccharides exprimés à la surface de la plupart des cellules de mammifère. Les GAGs sont définis comme étant des chaînes polysaccharidiques non ramifiées composées d'une répétition de disaccharides. Les GAGs de type héparane sulfate sont composés d'un même disaccharide modifié par épimérisation ou sulfatation. Les HSPG font partie des glycosaminoglycanes les plus fréquemment retrouvés. Les HSPG sont présents à la surface des hépatocytes, et leurs parties glycosidiques interagissant avec E2 permettent l'attachement non spécifique du VHC à ce facteur. L'interaction entre le VHC et les GAGs est faible, mais la quantité d'HSPG présente à la surface cellulaire en fait un point d'ancrage majeur (Koutsoudakis et al., 2006). Les déterminants impliqués dans cette interaction n'ont pas été caractérisés, mais il a pu être montré, via la délétion de la région hypervariable 1 (HVR1) de E2, que cette région est nécessaire pour la liaison du virus à ce facteur. Il a aussi été remarqué que la protéine E2 soluble ne peut plus se lier au HSPG lorsqu'il y a une compétition avec l'héparine (Barth et al., 2003, 2006). Or, de façon contradictoire, l'attachement de particules rétrovirales pseudotypées du VHC (VHCpp) au HSPG n'est pas inhibé par l'héparine. Ceci suggère que l'attachement du virus au HSPG est indépendant du complexe formé par les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (Callens et al., 2005).

Les syndécans sont des protéoglycanes de types héparane sulfate majoritairement retrouvés à la surface hépatocytaire (Jiang et al., 2013; Shi et al., 2013). L'apolipoprotéine E (apo E), présente à la surface des particules virales, a la particularité de pouvoir lier les syndécans et plus spécifiquement celui de type 1 (Jiang et al., 2012; Xu et al., 2015). Les HSPG agissent comme des facteurs d'attachement non spécifiques du VHC : ils permettent le rapprochement spatial du VHC vers les facteurs spécifiques nécessaires à l'entrée virale dans les cellules hépatocytaires.

I.4.a.i.3 Le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (« Low density lipoprotein » (LDL))

Le récepteur aux LDLs (LDL-r) est exprimé dans une large variété de tissus, cependant sa fonction de capture des lipoprotéines de faible densité dans le sang est spécifique des hépatocytes (Nahmias et al., 2006; Rigotti et al., 2003; Burlone et al., 2009). Ce récepteur est une protéine de 839 aa, constituée de 7 récepteurs adjacents de type A en N-terminal, d'une région riche en sérine thréonine, d'un domaine transmembranaire et de 50 résidus situés dans le cytoplasme en C-terminal (Beglova and Blacklow, 2005). Les particules virales circulantes, provenant de patients, peuvent lier le LDL-r alors que la glycoprotéine d'enveloppe E2 soluble et les VHCpp non (Molina et al., 2007; Triyatni et al., 2002). L'infection de particules virales produites en culture cellulaire (VHCcc) peut être également limitée par la compétition avec des VLDL et des anticorps anti-apoE (Owen et al., 2009). Ces différentes observations montrent que l'association des particules virales à l'apoE est importante lors de l'attachement du VHC au LDL-r. Cependant, la liaison des particules virales au LDL-r résulterait en une internalisation virale non productive (Albecka et al., 2012).

La première étape de capture des particules virales par les facteurs d'attachement non spécifiques est très importante. En effet, elle permet par la suite au VHC de se lier aux facteurs spécifiques nécessaires à l'entrée virale. Ces facteurs d'entrée spécifiques sont SR-BI, la tétraspanine CD81 (« *Cluster of differentiation 81* »), la claudine 1 (CLDN1) et l'occludine (OCLN).

I.4.a.i.4 SR-BI

SR-BI est préférentiellement exprimé dans les cellules du foie. C'est une glycoprotéine de 509 aa ayant deux domaines cytoplasmiques, deux domaines transmembranaires et une large boucle extracellulaire avec 9 sites potentiels de N-glycosylation (Acton et al., 1994). SR-BI est impliqué dans le métabolisme des lipides et lie de multiples ligands de la classe des lipoprotéines comme les VLDL, LDL et HDL (« *High Density Lipoprotein* ») (Voisset et al., 2005). Ce récepteur a la capacité de modifier la composition lipidique des membranes cellulaires. Cette fonctionnalité

permet à SR-BI d'avoir un rôle important dans l'apport de cholestérol au foie. La modification de l'organisation membranaire facilite la présence de CD81 à proximité de SR-BI, et par conséquent favorise l'infection par le VHC (Kapadia et al., 2007).

SR-BI interagit avec la protéine E2 soluble (Bartosch et al., 2003; Scarselli et al., 2002) et plus particulièrement la région HVR1 (Dao Thi et al., 2011). Cependant, il a été démontré que l'inhibition de l'infection n'est pas complète lors de la délétion de la région HVR1, suggérant que la liaison des particules virales à ce récepteur n'est pas spécifique du complexe E1E2 (Bankwitz et al., 2014; Catanese et al., 2010). De façon intéressante, des cinétiques d'inhibition avec des anticorps anti-SR-BI et anti-CD81 ont montré que SR-BI peut agir simultanément avec CD81 (Zeisel et al., 2007).

SR-BI interagit avec la protéine d'enveloppe E2 et facilite ainsi l'interaction du VHC avec la tetraspanine CD81 grâce à la modification de la composition lipidique de la membrane plasmique des cellules hépatocytaires. Ce facteur d'entrée permet de passer de l'étape de capture à l'étape d'entrée virale.

I.4.a.i.5 La tetraspanine CD81

La tetraspanine CD81 (Cormier et al., 2004b) est une protéine présente à la surface cellulaire exprimée dans une grande variété de cellules. C'est une protéine transmembranaire appartenant aux glycoprotéines membranaires de type III. CD81 est formée de deux boucles extracellulaires et d'une petite boucle intracellulaire. L'une des deux boucles extracellulaires, la plus longue (LEL : « *long extracellular loop* ») contient des éléments structuraux communs à la famille des tetraspanines. Ces éléments structuraux sont les ponts disulfures situés entre 4 résidus cystéines, formant une structure de sous-boucle contenant une région hyper variable commune entre les différents membres de la famille (Pileri et al., 1998). L'association des lipoprotéines au VHC masque le site d'interaction de E2 avec CD81, démontrant ainsi la nécessité d'un réarrangement de la membrane lipidique permettant l'accessibilité de E2 à CD81. Les domaines de E2 interagissant avec CD81 ont été précisément décrits (Flint et al., 1999; Lavie et al., 2014). Lorsqu'on utilise des anticorps anti-CD81, l'infection par des VHC_{pp}, VHC_{cc} et des particules virales provenant de patients sont inhibées. Une interaction directe entre les VHC_{pp} et CD81 a été démontrée, alors que cela n'a pas été observée

avec les VHCcc (Kapadia et al., 2007). Ces différentes études révèlent que la liaison de CD81 à E2 peut être modulée par E1. La délétion du domaine HVR1 sur la protéine E2 soluble augmente sa liaison à CD81, démontrant ainsi que ces deux glycoprotéines d'enveloppe ont une action complémentaire lors de l'entrée du virus (Roccasecca et al., 2003). Le tropisme du VHC pour les cellules hépatocytaires est spécifique de CD81 : en effet, les cellules de foie murin n'ayant pas à leur surface CD81 ne peuvent pas être infectées par le VHC. Des souris humanisées par génie génétique exprimant CD81 humaine sont permissives au VHC (Bitzegeio et al., 2010). La liaison du VHC à CD81 induit de multiples signaux dans la cellule, notamment la relocalisation du complexe virus-CD81 vers le pôle apical des hépatocytes où les particules virales seront internalisées (Mee et al., 2008). CD81 a également un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire adaptative par son interaction avec les lymphocytes B et T. Ceci peut conduire à la persistance virale, à des pathologies du foie et l'activation polyclonale des lymphocytes B. Ces phénomènes sont couramment observés chez les patients atteints d'hépatite C chronique (Machida et al., 2005).

Deux protéines des jonctions serrées, CLDN1 (Evans et al., 2007) et OCLN (Ploss et al., 2009) ont été identifiées comme étant deux autres facteurs nécessaires à l'entrée des particules virales dans les cellules hépatocytaires. Mais d'autres facteurs, mis en évidence plus récemment, sont aussi nécessaires à l'entrée virale comme le récepteur EGF (*Epidermal Growth Factor*), le récepteur de cholestérol Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) et le récepteur à la transferrine (TfR).

I.4.a.i.6 Le récepteur EGF

Le facteur EGFR est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des tyrosines kinase. Cette protéine de surface cellulaire lie une hormone de croissance. De façon endogène, la liaison du ligand à son récepteur induit la dimérisation du récepteur et son autophosphorylation ce qui permet à la cellule de proliférer (Gene ID: 1956). Différentes voies de signalisation cellulaire lors de l'infection par le VHC ont été mentionnées comme étant indépendantes de la phosphorylation de EGFR (Brazzoli et al., 2008). C'est le cas de la voie MAPK qui active une GTPase membranaire se liant à CD81 et interagissant avec la voie PI3K/Akt (Liu et al., 2012). Par conséquence, il a été

suggéré que ce facteur pouvait avoir un rôle important lors de l'entrée du VHC. Il a été montré en 2012 (Diao et al., 2012) que la liaison du VHC à CD81 entraînait l'activation du facteur EGFR par phosphorylation. Ceci conduit à l'activation d'une GTPase spécifique qui va promouvoir la migration latérale du complexe CD81-virus jusqu'au facteur CLDN1. Il a été montré que ce récepteur permettait la formation du complexe CD81-CLDN1 important lors de l'entrée du VHC (Lupberger et al., 2011).

I.4.a.i.7 CLDN1

La protéine CLDN1 est exprimée de façon prédominante dans les cellules du foie formant un réseau de jonctions serrées (Furuse and Tsukita, 2006).

Cette molécule est composée de 211 aa (22,7 Kda) comprenant deux boucles extracellulaires, 4 segments transmembranaires et 3 domaines intracellulaires avec des fragments hautement conservés dans la première boucle extracellulaire impliqués dans l'entrée du VHC (Hewitt et al., 2006). CLDN1 a un rôle important lors de l'étape post-attachement du virus à la surface cellulaire après la liaison à SR-BI et CD81. La localisation de CLDN1 est aussi essentielle à l'infection par le VHC, démontrant ainsi l'importance du phénomène de migration des particules virales au niveau des jonctions serrées lors de l'étape d'entrée (Dorner et al., 2011). Mais il a également été montré que CLDN1 était aussi présent en dehors des jonctions serrées, et que la fréquence d'association CD81-CLDN1 en dehors des jonctions serrées n'affectait pas le taux d'infection (Harris et al., 2008). En effet, il a été montré par microscopie que le VHC interagissait avec CLDN1 à la membrane basolatérale des cellules hépatocytaires (Coller et al., 2009). Lors de l'endocytose, les particules virales sont internalisées avec le complexe CD81 et CLDN1 (Evans et al., 2007). L'hétérodimère E1E2 interagit à la surface cellulaire avec CLDN1 (Douam et al., 2014). Deux autres membres de la famille des claudines ont été identifiés comme intervenant lors de l'entrée du virus : CLDN6 et CLDN9. De la même manière que CLDN1, ces protéines sont exprimées dans les cellules de foie (Zheng et al., 2007).

I.4.a.i.8 OCLN

OCLN est une protéine proche structurellement des claudines, également impliquée dans l'entrée et l'initiation de l'infection par le VHC (Lui et al., 2010; Ciesek et al., 2011). C'est une protéine de 60 KDa, composée de 4 régions transmembranaires et de deux boucles extracellulaires. Elle interagit directement avec E2 du VHC, facilitant ainsi l'entrée virale au niveau des jonctions serrées. Une inhibition de OCLN entraîne une diminution de l'entrée du VHC. Les protéines CD81 et OCLN présentes à la surface cellulaire permettent de lier spécifiquement le VHC conférant le tropisme de ce virus pour les cellules du foie (Benedicto et al., 2008, 2009).

I.4.a.i.9 Autres facteurs d'entrée

En 2012, le récepteur NPC1L1 a été identifié comme un nouveau facteur d'entrée du VHC (Sainz et al., 2012). Il a été montré que le « silencing » ou le blocage par des anticorps de ce facteur d'entrée inhibait l'infection du VHC. L'ézétimibe, qui empêche l'absorption du cholestérol, est capable d'inhiber efficacement l'infection du VHC *in vitro*. De manière très intéressante cette équipe a montré que l'inhibition de ce facteur d'entrée empêchait l'infection du VHC juste en amont de l'étape de fusion. Ceci suggère qu'il est possible que la fusion virale dépende de la composition en cholestérol de la membrane (Sainz et al., 2012 ; Felmlee et al., 2013).

Les TfR 1 et 2 sont des protéines transmembranaires exprimées dans le foie. Ces protéines captent le fer présent dans le sang pour le transférer au compartiment intracellulaire. Lors d'une infection par le VHC, il est observé chez les patients une surcharge en fer due à une altération de l'expression du récepteur TfR1, entraînant une dérégulation de l'homéostasie du fer. Le récepteur TfR1 agit simultanément avec les protéines de jonctions serrées comme un récepteur de « clusterisation » et d'internalisation du virus (Martin and Uprichard, 2013).

En résumé, dans un premier temps, les particules virales circulantes dans le sang des patients sont captées au niveau des résidus glycosidiques des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 par les lectines DC-SIGN et L-SIGN. Cette capture permet aux particules virales d'être spatialement rapprochées des cellules hépatocytaires. A la surface des cellules les GAGs et le LDL-r facilitent l'attachement initial des particules

virales par une interaction avec les lipoprotéines associées aux virions. La liaison du VHC au LDL-r entraîne une internalisation non productive des virus. Les particules virales se lient ensuite aux récepteurs d'entrée SR-BI et CD81. L'interaction avec SR-BI peut être directe, via E2, ou indirecte via les lipoprotéines. L'attachement des particules virales au récepteur CD81 est ensuite spécifique. Puis CLDN1 interagit avec les particules virales. Les particules virales peuvent également migrer latéralement jusqu'aux jonctions serrées où elles pourront interagir avec l'OCN. L'entrée du virus est contrôlée par la présence de différents facteurs d'entrée, mais aussi par l'absence de facteur inhibiteur. Le VHC est ensuite internalisé dans les cellules hépatocytaires.

I.4.b Internalisation, endocytose et fusion

Après l'étape d'attachement aux facteurs d'entrée, le VHC est internalisé dans les cellules hépatocytaires par un mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine. Durant ce processus, les particules virales induisent un bourgeonnement vers l'intérieur de la membrane plasmique (Blanchard et al., 2006). Ce phénomène se déroule en association avec le complexe CD81-CLDN1 et OCN. Ces différentes protéines sont ensuite internalisées en même temps que les particules virales (Bartosch et al., 2003; Farquhar et al., 2011, 2012).

Puis, les particules virales suivent la voie des endosomes précoces. Cependant, d'autres voies alternatives peuvent être utilisées (Matsuda et al., 2014). Dans les cellules Huh-7, les virions sont transportés rapidement aux endosomes via la protéine Rab5a le long des filaments d'actine, où la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale a lieu (Coller et al., 2009; Stone et al., 2007). L'usage de la bafilomycine A1 affecte l'acidification du compartiment endosomal. Cette molécule bloque l'infection du VHC, mettant en avant que la libération de l'ARN viral, lors du processus de fusion des membranes, est pH-dépendant (pH optimal 5,5) (Meertens et al., 2006). L'interaction entre E2 et CD81 semble aussi primordiale lors de la fusion entre la membrane endosomale et l'enveloppe virale (Sharma et al., 2011). Cependant, comme mentionné précédemment, la protéine E2 n'est pas une protéine de fusion (Khan et al., 2014; Kong et al., 2013). Ceci laisse suggérer que soit la protéine E1 soit le complexe E1E2 est important lors du processus de fusion. A l'issue de ce processus d'endocytose, le matériel génétique viral est libéré dans le cytoplasme de la cellule, permettant ainsi la

traduction de la polyprotéine et la mise en place du processus de réarrangement membranaire nécessaire à la réplication. Cependant, le processus de fusion et le rôle exact des glycoprotéines d'enveloppe dans ce mécanisme restent peu compris. La structure cristallographique complète de E1 et de E2 permettrait une meilleure compréhension de cette étape lors du processus d'entrée du virus.

I.4.c Traduction

A la suite du processus de fusion et de décapsidation du virus, la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule a lieu. L'ARN viral sert alors directement de matrice à la traduction de la polyprotéine virale. La traduction de l'ARN viral à l'aide de facteurs cellulaires est initiée à proximité du RE. Cette proximité permet lors de la traduction du peptide signal d'adresser la polyprotéine directement dans ce compartiment. Puis les protéases virales et cellulaires permettent la libération et la maturation des 10 protéines virales : core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (Moradpour and Penin, 2013). Les différentes protéines structurales et non structurales sont clivées à partir de la polyprotéine selon un ordre bien précis (voir I.3.c). Certaines des protéines non-structurales vont intervenir dans la formation du complexe de réplication nécessaire à la formation des nouveaux virions.

I.4.d Réplication

Après leur traduction, les protéines virales sont associées à des membranes dérivées du RE. La réplication du génome du VHC induit un réarrangement massif des membranes intracellulaires appelé « membranous web » induit par NS4B (Egger et al., 2002). Les protéines nécessaires à la réplication du VHC forment alors un complexe de réplication au sein du « membranous web » où est présent l'ARN viral et l'ARN nouvellement synthétisé (Brass et al., 2009). Ce réseau membranaire a initialement été décrit dans les cellules U-2 OS exprimant la polyprotéine du VHC : cela a permis de démontrer que la réplication virale ne dépend pas de la réplication active de l'ARN mais uniquement de l'expression des protéines non-structurales (Egger et al., 2002). Des analyses utilisant des techniques de microscopie électronique 3D ont permis la

reconstruction de ces « membranous web », montrant l'apparition de vésicules ayant des doubles membranes (DMVs : *double membranes vesicles*) avec un diamètre moyen de 150 nm (Ferraris et al., 2010; Romero-Brey et al., 2012). Les protéines NS3, NS4A, NS5A et NS5B suffisent pour former un complexe de réplication efficace, comme cela a été montré avec les unités indépendantes de réplication : les réplicons (Lohmann, 1999). NS4B intervient en modulant l'état de phosphorylation de NS5A régulant ainsi les niveaux de réplication (Lindenbach et al., 2007). La protéine NS5A interagit également avec les autres protéines virales du complexe de réplication et avec l'ARN viral (Huang et al., 2005). La RdRp (NS5B) est l'enzyme permettant de synthétiser les nouveaux brins d'ARN. L'ARN nouvellement synthétisé est traduit pour produire les nouvelles protéines virales. Ce nouveau brin d'ARN sert également de matrice à la réplication de l'ARN viral et permet progressivement l'assemblage de nouveaux virions. Les gouttelettes lipidiques sont des organelles qui ont une fonction de stockage d'ester de cholesteryl et de triglycérides, qui sont entourées par une monocouche de phospholipides hébergeant de nombreuses protéines. De façon intéressante, les gouttelettes lipidiques sont retrouvées à proximité des « membranous web », car elles ont un rôle central lors de la coordination de la synthèse de l'ARN et dans la morphogénèse des virions. Des ARN doubles brins ont également été trouvés au niveau des gouttelettes lipidiques, suggérant un rôle de ces derniers lors de la réplication. (Miyanari et al., 2007).

I.4.d.i Régulation de la réplication par les protéines cellulaires

Les protéines cellulaires peuvent tout d'abord réguler l'étape de traduction, ayant un impact sur la réplication. Par exemple la protéine PTB (PTB : « *polypyrimidine tract-binding protein* ») va interagir avec la région 3'UTR de l'ARN viral, régulant ainsi la traduction de la polyprotéine et agissant indirectement sur l'étape de réplication (Chang and Luo, 2006). De manière complémentaire, la phosphoprotéine La (« *La autoantigen* ») interagit avec les parties 5' et 3' UTR, régulant elle aussi la traduction virale (Ali and Siddiqui, 1997; Domitrovich et al., 2005; Spangberg et al., 1999).

Différentes protéines cellulaires ont aussi été décrites comme influençant directement la réplication. C'est le cas de la protéine hVAP-A (Evans et al., 2004), qui régule positivement la réplication du VHC en interagissant avec la forme hyperphosphorylée de la protéine NS5A. La protéine cyclophiline A interagit également

avec NS5A, entraînant un changement dans sa conformation contribuant à l'amplification de la réplication des ARN viraux ainsi qu'à l'assemblage des particules virales (Kaul et al., 2009; Madan et al., 2014). La « *Protein kinase C-related kinase 2* » (PRK2) influence l'activité de la RdRp NS5B en la phosphorylant, améliorant ainsi de façon considérable la réplication (Kim et al., 2004). Le facteur GBF1 (« *Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1* ») est impliqué quant à lui, dans l'activité des complexes de réplication formés au niveau des « membranous web » (Goueslain et al., 2010; Farhat et al., 2013 et 2016). Le micro ARN miR122 est également essentiel à la réplication du VHC. C'est un microARN exprimé spécifiquement dans le foie, liant l'ARN viral et permettant ainsi de le surexprimer (Jopling et al., 2005). La phosphatidyl-inositol-4 kinase-III est nécessaire au maintien de l'intégrité et au bon fonctionnement du complexe de réplication (Reiss et al., 2011), la protéine ARF-GAP1 lie la protéine NS5A (Li et al., 2014), les protéines VAP-A (*vesicle-associated membrane protein-associated protein A*) et VAP-B sont aussi nécessaires à la régulation positive de la réplication (Paul et al., 2013).

I.4.e Assemblage et propagation du VHC

La morphogénèse des particules virales requiert simultanément l'accumulation spatiale et temporelle des protéines structurales et de l'ARN génomique (Lindenbach, 2013). Lorsque la nucléocapside virale contenant l'ARN est formée, celle-ci est enveloppée dans une membrane provenant du RE. Puis les particules virales sont sécrétées hors des cellules par exocytose via la voie de biosynthèse des VLDL. L'assemblage, le bourgeonnement et la libération des virions sont difficiles à détecter dans les cellules infectées, suggérant que ce processus est rapide.

Un des composants majeurs du VHC est la protéine core qui interagit avec l'ARN génomique pour former la nucléocapside. La protéine core sous forme de dimère est transférée à proximité des gouttelettes lipidiques présentes dans le cytosol (Barba et al., 1997; Boulant et al., 2005). L'interaction de la protéine core avec les gouttelettes lipidiques est essentielle au recrutement des autres composants viraux nécessaires à l'assemblage des virions (Miyazawa et al., 2007). Cette liaison peut être influencée par différentes protéines cellulaires, comme le diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1)

(Herker et al., 2010), la phospholipase A2 cytosolique régulée par une MAPK (PLA2G4) ainsi que son produit, l'acide arachidonique (Menzel et al., 2012).

L'autre composant majeur des particules virales est le complexe formé par les glycoprotéines d'enveloppe E1E2. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 forment un complexe d'hétérodimères non covalent retenu dans la membrane du RE (Dubuisson et al., 1994). Ce complexe de glycoprotéines a besoin de migrer à proximité des gouttelettes lipidiques pour s'assembler (Miyanari et al., 2007). Il a été montré que NS2 interagissait avec E1, E2 et P7, et que ces interactions sont essentielles à la migration du complexe E1E2 sur le site d'assemblage des nouveaux virions (Jirasko et al., 2010; Popescu et al., 2011). La présence de ponts disulfures entre les glycoprotéines d'enveloppe et la surface des particules virales suggère que les interactions latérales protéine-protéine ont un rôle dans le bourgeonnement des particules virales (Vieyres et al., 2010).

Les protéines p7, NS2 et les autres protéines non structurales sont aussi nécessaires au processus d'assemblage. Parmi ces protéines, NS5A a un rôle prédominant lors de la transition entre la réplication et l'assemblage (Lindenbach, 2013). Le domaine C-terminal de cette protéine interagit avec les gouttelettes lipidiques liées à la protéine core (Miyanari et al., 2007) et plus spécifiquement permet la phosphorylation d'un résidu sérine, essentielle à la régulation de l'assemblage viral (Tellinghuisen et al., 2008a).

La sécrétion des virions est étroitement liée à la voie de biogénèse des VLDL (Gastaminza et al., 2008) et par conséquent les virions se retrouvent associés à apoE, apoB, apoA1, apoC1, apoC2 et apoC3 (Bartenschlager et al., 2011; Catanese et al., 2013). Le complexe de transport endosomal (ESCRT : « *endosomal-sorting complex required for transport* ») a aussi un rôle lors du bourgeonnement des particules virales. Le complexe ESCRT est une machinerie cellulaire impliquée dans le bourgeonnement des vésicules provenant du cytoplasme et dans la formation des corps multivésiculaires. Durant la sécrétion des particules virales, les glycanes sont associés aux glycoprotéines d'enveloppe (Vieyres et al., 2010).

I.4.f Transmission cellule-cellule

La transmission du virus à de nouvelles cellules hépatocytaires se fait selon deux voies distinctes : (1) la voie d'entrée des particules virales décrite précédemment et (2) la voie de transmission cellule-cellule (Chang et al., 2003b). Le mode de transmission cellule-cellule est une des alternatives trouvées par le virus pour échapper aux anticorps neutralisants. C'est aussi le mode d'infection utilisé préférentiellement par les virus résistants aux thérapies utilisant des molécules ciblant directement le virus (DAA : « *Direct antiviral Agent* ») (Xiao et al., 2014). Les protéines SR-BI, CLDN1 et OCLN sont importantes lors de la transmission du virus entre hépatocytes (Timpe et al., 2007). En revanche, le rôle de CD81 lors de la transmission du virus selon le mode cellule-cellule est controversé (Brimacombe et al., 2011; Timpe et al., 2007).

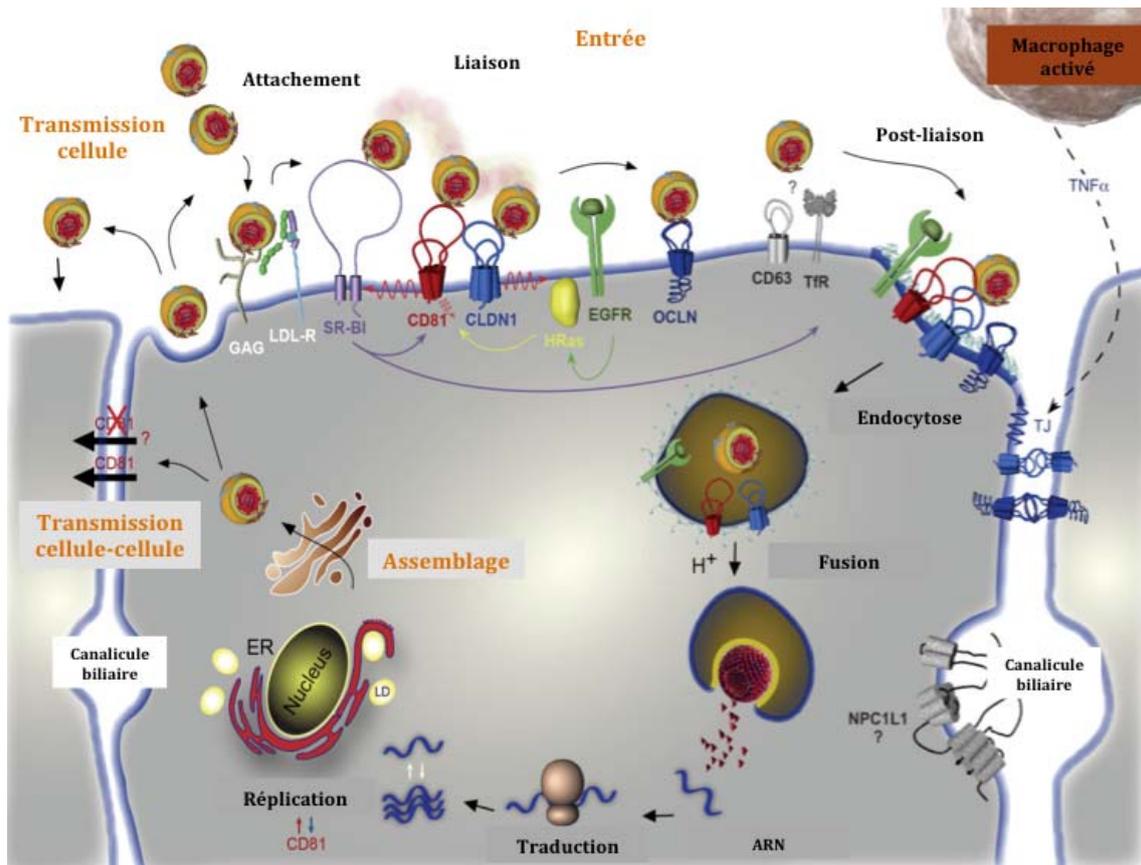


Figure 11: Cycle viral du VHC. Le VHC initie son infection dans les hépatocytes par une étape d'attachement à des facteurs non spécifiques présents à la surface cellulaire. Les GAG et le LDL-r ont un rôle majeur lors de cette étape d'entrée du virus. Les particules virales peuvent alors interagir avec certains des facteurs d'entrée spécifiques. Le VHC entre en contact en premier avec SR-BI qui facilite l'association de la protéine d'enveloppe virale E2 avec CD81. CD81 et la protéine de jonction serrée CLDN1 forment un complexe essentiel à l'entrée du VHC qui est régulé par le récepteur au facteur de croissance épithéliale (EGFR : *Epidermal Growth Factor*). Puis le VHC interagit avec l'occludine, qui est aussi une protéine des jonctions serrées. Le Tfr, la tetraspanine CD63, et le transporteur de cholestérol Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1L1) ont également un rôle lors de l'entrée du VHC dans les hépatocytes. Cependant, leur mécanisme d'action n'a pas encore été élucidé. La régulation de l'entrée du VHC dépend de la diffusion au sein de la membrane de CD81 (schématisé par une flèche rouge). Le virus est ensuite internalisé par endocytose avec le complexe CD81/CLDN1 et EGFR. L'endocytose est favorisée par les propriétés de transfert lipidique de SR-BI. Après fusion de l'enveloppe virale à faible pH avec la membrane endosomale, le génome viral est relargué dans le cytosol. Les facteurs cellulaires nécessaires à la traduction de la polyprotéine unique sont recrutés, puis cette dernière est clivée afin d'obtenir les protéines virales matures nécessaires à la réplication de l'ARN viral. Parallèlement, l'ARN viral est répliqué afin de former de nouveaux virions. Les nouveaux virions sont assemblés dans les compartiments du RE puis sont libérés par la voie de biogénèse des VLDL. Ce processus est réalisé à proximité des gouttelettes lipidiques (LD). Les virions sont relargués et peuvent infecter de nouvelles cellules soit par le milieu extérieur, soit selon un mode de transmission de cellule à cellule (D'après Fénéant et al., 2014).

I.5 Modèles d'études

Etudier et approfondir notre compréhension du cycle infectieux du VHC a été indispensable afin de lutter efficacement contre ce virus. Pour cela, différents systèmes d'études ont été mis en place. En 1997, le développement de clones moléculaires infectieux provenant de chimpanzés a représenté une avancée importante, malgré le fait que ces particules ne puissent pas être produites en culture cellulaire (Kolykhalov et al., 1997b). Par la suite, différents systèmes *in vitro* utilisables en culture cellulaire ont été développés : la protéine E2 soluble, le réplicon subgénomique, les VHCpp, le VHCcc, et les systèmes de cellules permissives au VHC. Les modèles *in vivo* permettent d'étudier les interactions hôte-pathogène ainsi que les défenses mises en place par le système immunitaire lors d'une infection.

I.5.a Système *in vitro*

I.5.a.i La protéine E2 soluble

Le premier outil utilisé pour identifier les récepteurs avec lesquels interagit le VHC lors de l'entrée dans les cellules est la glycoprotéine d'enveloppe E2 soluble (E2s). E2s est dépourvue de fragment transmembranaire, via une délétion à l'aa 661 (Michalak et al., 1997), permettant ainsi d'obtenir une forme soluble de la protéine en culture cellulaire. L'identification des facteurs d'entrée comme la tetraspanine CD81 (Pileri et al., 1998) et le récepteur SR-BI (Scarselli et al., 2002), a été réalisée à l'aide de E2s dans des lignées d'hépatocarcinomes humains. E2s a son propre repliement qui permet d'interagir avec les facteurs d'entrée (CD81) sur les cellules hépatocytaires. Récemment, la structure de l'ectodomaine de E2 en complexe avec deux Fabs a été résolue, révélant une forme globulaire ayant un repliement similaire aux IgG et présentant des régions flexibles (Khan et al., 2014). De façon intéressante, la région centrale de E2 ne contient pas de peptide de fusion et ne subit pas d'importants réarrangements conformationnels. Il a aussi été montré que des anticorps anti-E2 provenant de patients sont suffisants pour bloquer l'entrée des VHCcc (Whidby et al., 2009).

Afin de trouver de nouvelles molécules inhibitrices contre les protéines virales NS3, NS5A et NS5B des criblages sont réalisés à partir de réplicons exprimant

individuellement ces protéines (Kataoka et al., 2016 ; Yang et al., 2017). Des vecteurs d'expressions contenant spécifiquement le domaine protéasique de NS3 ainsi que son cofacteur NS4A peuvent être également être utilisés (Berdichevsky et al., 2003 ; Pessoa et al., 2016).

I.5.a.ii Le réplicon subgénomique

Le développement des réplicons subgénomiques et génomiques permet d'étudier spécifiquement l'étape de réplication du VHC en s'affranchissant de l'étape d'entrée (Figure 12).

Le développement de la première unité répllicative sub-génomique a été initié en 1999 dans des cellules humaines. Ce système dérive d'une construction bi-cistronique, ayant d'une part un gène de résistance à un antibiotique exprimé à partir de l'IRES du VHC, et d'autre part, les gènes codant pour les protéines non structurales, NS3/4A, NS4B, NS5A et NS5B, et la région 3' non codante du VHC exprimés à partir de l'IRES du virus de l'encephalomyocardite (EMCV : « *Encephalomyocarditis Virus* ») (Lohmann, 1999). Des réplicons mono-cistroniques ont également été mis au point. Ces réplicons sont sous le contrôle uniquement de l'IRES du VHC. Les réplicons génomiques contiennent quant à eux tout le génome viral, mais ne sont pas capables de produire des particules virales infectieuses (Pietschmann et al., 2002).

Par la suite, plusieurs mutations adaptatives ont été insérées dans le réplicon, permettant d'obtenir des systèmes avec une grande capacité répllicative. Ces mutations ont été insérées dans NS3, NS4B et NS5A. Différents systèmes de réplicons ont été obtenus avec différents génotypes du VHC, ce qui a permis en partie le développement des DAAs (King et al., 2002).

Les paramètres nécessaires sont manquants ou erronés.

Figure 12: Réplicon bi-cistronique et réplicon mono-cistronique Le réplicon bi-cistronique possède un gène rapporteur placé sous le contrôle de l'IRES du VHC, tandis que les gènes codant pour les protéines non structurales sont sous le contrôle de l'IRES du EMCV. Le réplicon mono-cistronique est entièrement sous le contrôle de l'IRES du VHC. Le gène rapporteur utilisé ici est la néomycine (Kao et al., 2012).

I.5.a.iv Les VHCpp

L'étude de l'entrée du VHC repose en grande partie sur les particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC (VHCpp) (Bartosch et al., 2003) (Figure 14). Les VHCpp offrent la possibilité d'étudier l'étape d'entrée du virus en s'affranchissant des autres étapes du cycle viral. Les VHCpp sont produites par co-transfection de trois plasmides dans des cellules de reins 293T (HEK-293T): (1) un plasmide exprimant les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC, (2) un plasmide exprimant les protéines Gal-Pol d'un rétrovirus, le virus de la leucémie murine (MLV : *Murine Leukemia Virus*) permettant de coder les protéines de capsid nécessaires aux VHCpp et (3) un plasmide exprimant le génome rétroviral contenant le gène rapporteur de la luciférase ou de la GFP flanqué de séquence LTRs (LTR : « *long terminal repeat* »). Ces dernières séquences sont nécessaires à l'encapsidation et l'incorporation du génome viral des VHCpp. Ces particules expriment en surface les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, ce qui permet un cycle d'infection unique dans des lignées hépatocytaires en culture cellulaire. Le gène rapporteur permet de quantifier le niveau d'infection des VHCpp après infection de cellules Huh-7 par exemple. Ce système permet d'étudier le rôle des glycoprotéines E1 et E2, tous génotypes confondus, lors de l'entrée du virus, et également d'identifier des facteurs interagissant avec ces glycoprotéines d'enveloppe (Zeisel et al., 2013). Il est cependant important de noter que les VHCpp ne sont pas associées aux lipoprotéines car elles sont produites dans des cellules de rein qui ne les synthétisent pas. La morphologie du virion et le mécanisme d'entrée sont donc différents de ceux des VHCcc (Bonnaïfous et al., 2010).

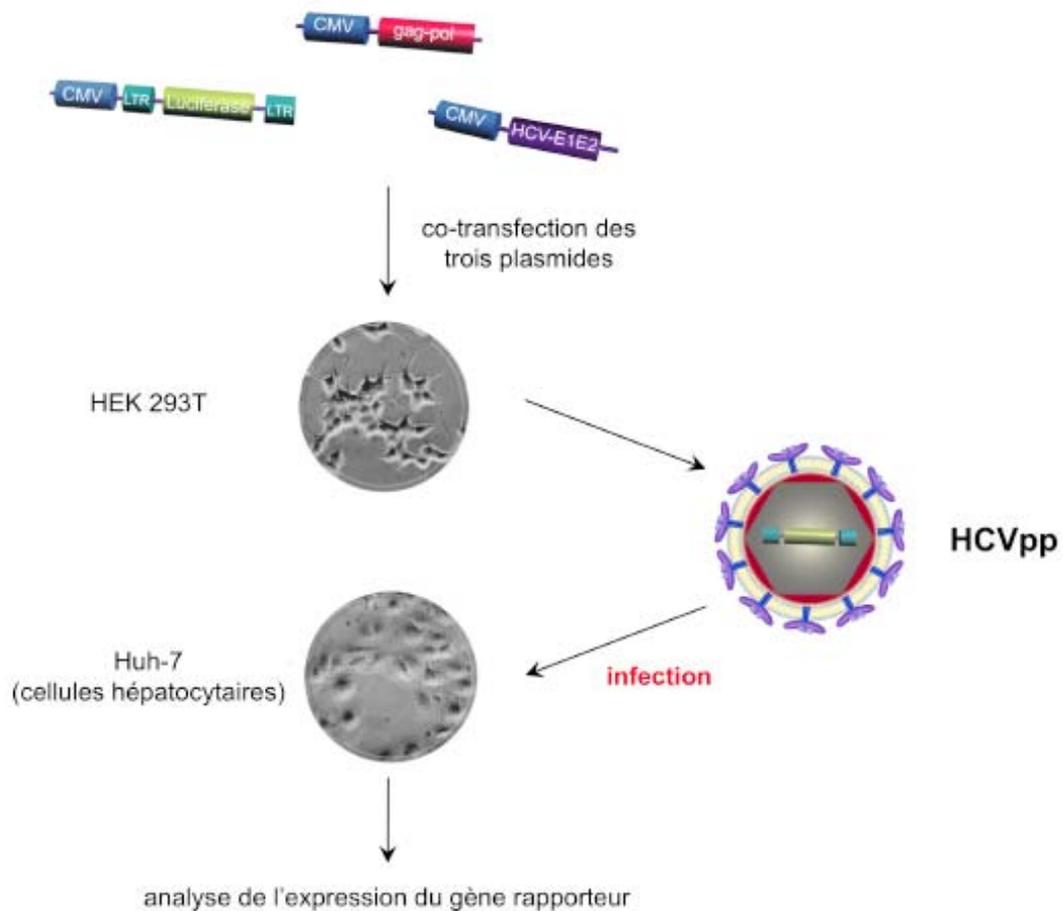


Figure 13: Modèle cellulaire VHCpp Les VHCpp sont obtenues par co-transfection de trois vecteurs dans les cellules HEK-293T : (1) un vecteur contenant le mini-génome codant le gène de la luciférase ; (2) un vecteur permettant l'expression des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC et (3) un vecteur permettant l'expression des protéines de capsid gag et pol du MLV permettant l'encapsidation, la transcription inverse et l'intégration du mini-génome. Les particules pseudotypées produites dans le surnageant des cellules HEK-293T servent à réinfecter, par un cycle unique d'infection, les cellules Huh-7. Le caractère infectieux des VHCpp est contrôlé par l'émission du gène de la luciférase dans les cellules hépatocytaires Huh-7.

I.5.a.iii Le système VHCcc

Dans un premier temps, isoler des souches virales provenant de patients infectés par le VHC s'est avéré difficile. Ce n'est qu'en 2005 que le virus de génotype 2a d'un patient Japonais, souffrant d'une hépatite fulminante, a pu être isolé et mis en culture cellulaire. Cette souche virale nommée JFH1 (JFH1 : « *Japanese Fulminant Hepatitis* ») a permis d'avoir des taux d'infection élevés de VHC en culture cellulaire (VHCcc) dans des cellules Huh-7 (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005)(Figure 13). Ce modèle de culture cellulaire est aussi infectieux dans les hépatocytes primaires humains ainsi que dans les modèles animaux. Il a permis l'étude du cycle viral complet du VHC et en particulier un approfondissement des connaissances sur les étapes d'assemblage, de sécrétion et de propagation cellule-cellule du VHC qui étaient peu connues (Mancone et al., 2011). Des mutations d'adaptation ont été introduites dans le génome JFH1 (par exemple C- NS2) afin d'obtenir du virus se répliquant et se propageant de manière plus efficace en culture cellulaire (Lindenbach et al., 2005; Lohmann et al., 2003). Des souches chimériques ont également été générées afin de pouvoir travailler avec l'ensemble des génotypes du VHC. Ces souches ont été obtenues en utilisant les protéines non-structurales, la région 3'UTR de la souche JFH1 et les protéines structurales d'un génotype donné (Gottwein et al., 2011; Scheel et al., 2011). Des génomes rapporteurs, fusionnés avec des protéines virales (par exemple NS5A), ont été créés : ils permettent de mesurer la dynamique de réplication du virus. Des gènes rapporteurs ont également été insérés dans le génotype viral afin de pouvoir quantifier le virus. On peut également quantifier le virus en réalisant des titres infectieux. Une alternative aux VHCcc est le VHC trans-complémenté (VHCtcp). Ce système est basé sur la transfection d'une part d'un réplicon et d'autre part d'un virus helper ou d'un système contenant uniquement les gènes codant les protéines nécessaires à l'assemblage des particules virales. Ce système permet d'effectuer par les VHCtcp un seul cycle d'infection de la même manière que les VHCpp (Steinmann et al., 2008). Il permet de délivrer les protéines structurales du VHC sans risque, c'est donc un modèle intéressant pour l'étude et le développement de souches vaccinales.

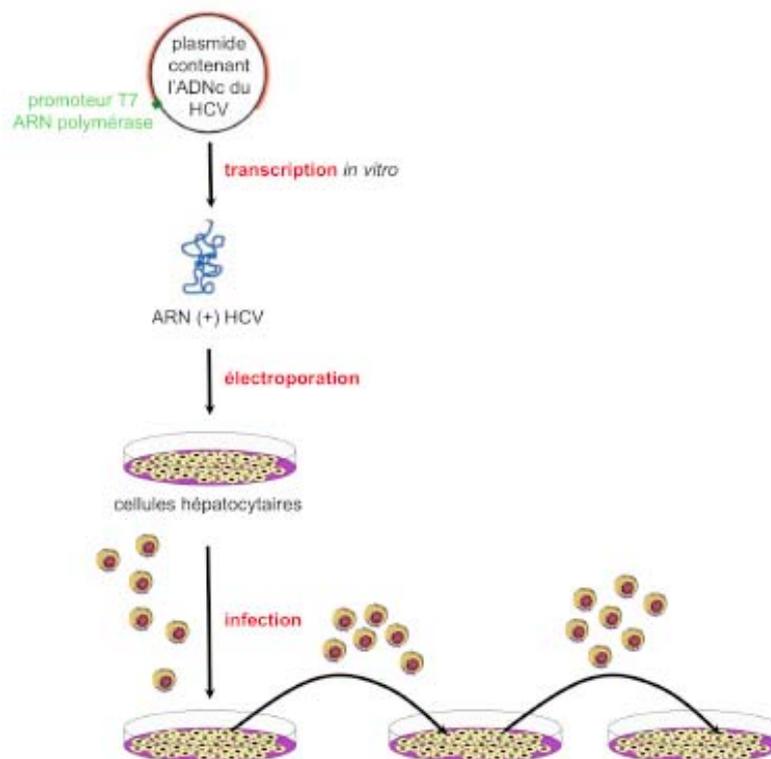


Figure 14 : Modèle de culture VHCcc. Le vecteur permettant l'expression de l'ADNc provenant de la souche virale JFH-1 est transcrit *in vitro*. Le transcrit est ensuite électroporé dans des cellules Huh-7. Les particules virales VHCcc sont produites de la même manière que le VHC. Les particules virales sont récupérées dans le surnageant et servent à réinfecter des cellules Huh-7.

I.5.a.v Le système de cellule permissive au VHC

La mise au point de systèmes cellulaires permettant d'étudier l'infection du VHC représente un grand défi depuis la découverte du virus. Plus le système cellulaire utilisé est proche de la réalité, plus il est possible d'étudier l'implication de l'hôte dans l'infection, la clairance virale et la persistance de l'infection. Les cellules naturellement permissives au VHC sont les hépatocytes primaires humains, les cellules Huh-7 et leurs dérivés (Blight et al., 2002). Le cycle viral du VHC est donc préférentiellement étudié dans ces types cellulaires. D'autres systèmes cellulaires permissifs ont aussi été mis au point.

I.5.a.v.1 Hépatocytes primaires humains

Les hépatocytes primaires humains sont les cellules les plus appropriées pour étudier l'infection du VHC. Cependant, la faible disponibilité de ces cellules provenant de biopsie de patients, les coûts relativement élevés, la perte de différenciation et la survie difficile en culture cellulaire rendent leur utilisation difficile. De plus, les hépatocytes primaires humains provenant de patients différents présentent une forte variabilité génétique ainsi qu'une forte hétérogénéité dans les taux d'infection virale.

I.5.a.v.2 Huh7 et dérivés

L'hétérogénéité des cellules hépatocytaires est utilisée pour sélectionner des clones cellulaires permettant des hauts niveaux de réplication du virus, comme c'est le cas pour les cellules Huh7.5 (Blight et al., 2002). En effet, ces cellules ont une perte de fonction due à une mutation faux sens rendant la voie de signalisation RIG-I défectueuse. Cette voie est essentielle afin d'avoir une réponse immunitaire efficace. Cette lignée cellulaire a donc des taux élevés de production virale (Sumpter et al., 2005). Le fait que ces lignées cellulaires ne soient pas polarisées est une limitation à leur utilisation. En effet, l'absence de polarisation ne permet pas de reproduire la compartimentation des récepteurs du VHC ou encore l'aspect unidirectionnel de la sécrétion des virions. De plus, certains aspects de l'entrée du virus, de l'assemblage et de l'interaction avec les

lipoprotéines ou encore de la propagation cellule-cellule ne peuvent pas être reproduits en cellules Huh7.5 (Steinmann and Pietschmann, 2013). En revanche, les cellules HepG2 sont polarisées en culture cellulaire, et elles expriment à leur surface la tétraspanine CD81 et miR122. En conséquence, elles sont permissives au VHC et la réplication virale peut avoir lieu. Cependant ces cellules sont peu utilisées car leurs taux d'infection est faible (Flint et al., 2006; Mee et al., 2008).

I.5.a.v.3 Cellules fœtales de foie humain

Les cellules fœtales de foie humain peuvent être utilisées également pour l'étude du VHC. Cependant ces cellules sont moins permissives que les cellules provenant d'hépatocarcinomes humain, et leurs taux d'infection varient en fonction des donneurs (Lazaro et al., 2007).

I.5.a.v.4 Microsomes d'hépatocytes humain

Les microsomes d'hépatocytes humains sont des îlots d'hépatocytes primaires humains (MPCC : « *micropatterned co-cultures* ») ayant une quantité importante de collagène, additionnée de fibroblastes. Les hépatocytes primaires humains de ce système de culture sont polarisés et permissifs au VHC, mais l'efficacité d'infection est faible à cause de la réponse immunitaire innée antivirale des patients. Cependant, l'utilisation de MPCCs avec une stratégie d'inhibition de l'interféron (l'IFN) permettant de médier la réponse antivirale, améliore la physiologie et la survie des cellules et ainsi augmente l'infection du VHC (Ploss et al., 2010).

I.5.a.v.5 Autres cellules

Les lignées cellulaires dérivant d'autres organes peuvent être également rendues permissives au VHC comme c'est le cas pour les cellules HEK-293T (HEK : « *human embryonic kidney* ») dérivant du rein (Ali et al., 2004), ou encore des cellules HeLa provenant d'une métastase d'une patiente souffrant d'un cancer du col de l'utérus (Zhu et al., 2003). Les cellules HEK-293T ont été modifiées afin d'exprimer les facteurs d'entrée

CD81, CLDN1, OCLN indispensables pour l'infection du VHC (Da costa 2012). En revanche, l'expression de OCLN semble être suffisante pour les cellules HeLa (Zhu et al., 2003 ; Kohaar et al., 2010). Des cellules souches pluripotentes et des cellules embryonnaires humaines peuvent être également infectées par le VHCcc, offrant l'opportunité d'étudier la contribution génétique de l'hôte dans la pathogénèse du VHC (Roelandt et al., 2012; Schwartz et al., 2012). Cependant dans ces différents types cellulaires, le taux d'expression et de réplication du VHC est souvent plus faible que dans les lignées hépatocytaires, notamment à cause de l'absence de miR122 (Bartenschlager et al., 2011). Des lignées modifiées exprimant miR-122 ont été mises au point. Ainsi, l'expression de ce microARN dans les lignées HEK-293T (Chang et al., 2008) et HepG2 (Narbus et al., 2011) permet d'avoir une réplication virale plus importante.

I.5.b Les modèles *in vivo*

I.5.b.i Chimpanzé

Le modèle chimpanzé (*Pan troglodytes*) a permis l'identification du VHC en 1989 (Choo et al., 1989, Weiner et al., 1990). Les chimpanzés ont plus de 98% d'identité génétique avec l'homme. Ils sont donc naturellement permissifs aux infections par le VHC provenant de sera de patients ou produit en culture cellulaire. Le virus utilise les mêmes facteurs d'entrée que ceux découverts chez l'homme pour infecter les hépatocytes. Chez le chimpanzé, la virémie observée est persistante et la phase aiguë d'infection est limitée. De plus, les chimpanzés ne développent ni fibrose ni cirrhose (Bukh et al., 2001). Cependant ce modèle a permis l'étude de la réponse immunitaire mise en place lors d'une infection par le virus (Bigger et al., 2001) ainsi que l'évaluation de vaccins candidats (Mikkelsen et al., 2011), l'étude de la réponse immunitaire après vaccination (Bukh et al., 2001) et des tests de nouvelles thérapies antivirales (Olsen et al., 2011; Bukh et al., 2004). Toutefois depuis 2013, pour des raisons éthiques, les études expérimentales sur les chimpanzés ne sont plus autorisées en France.

I.5.b.ii Tupaia

Les toupayes (*Tupaia belangeri*) peuvent aussi être infectés par le VHC (Xie et al., 1998). Le VHC utilise des récepteurs orthologues aux récepteurs humains (CD81, SR-BI, CLDN1 et OCLN) pour infecter les hépatocytes de toupaye. Cependant les infections par le VHC dans cette espèce ne permettent que des virémies transitoires correspondant à la phase aiguë chez l'homme (Xu et al., 2007). Alors que des résultats encourageant sont observés, l'incapacité à reproduire la phase chronique d'infection du VHC, la forte diversité génétique et les conditions de captivités de ces animaux limitent l'étude du VHC sur ce modèle.

I.5.b.iii Souris génétiquement humanisées

I.5.b.iii. 1 Etude de l'entrée du VHC

Les souris sont génétiquement résistantes aux infections par le VHC car les étapes d'entrée et de réplication du virus sont très limitées. La seconde boucle extracellulaire de CD81 et de OCLN ont été identifiées comme étant responsables de la restriction du tropisme entre espèces du VHC (Brazzoli et al., 2008; Ploss et al., 2009). Les souris humanisées vont exprimer les protéines humaines CD81 et OCLN, soit par délivrance d'un gène provenant d'adénovirus soit par expression transgénique. Ces souris peuvent alors être infectées par le VHC, mais le cycle viral est restreint à l'étape d'entrée. En effet, dans ce modèle, il n'y a pas d'accumulation d'ARN viral indiquant que l'étape de réplication est limitée (Dorner et al., 2011). Ce modèle peut être utilisé pour évaluer un candidat vaccin et pour la mise au point d'anticorps neutralisants.

I.5.b.iii. 2 Etude du cycle complet VHC

En combinant l'expression de facteurs d'entrée humains, CD81 et OCLN, avec un blocage de la réponse immunitaire de la souris, il est possible d'avoir un cycle viral complet. Le blocage de la réponse immunitaire se fait par l'utilisation de souris STAT1-/- entraînant une faible expression des lymphocytes T régulateurs et une diminution de l'expression de l'IFN α et β , ceci étant responsable de la diminution de l'efficacité de la réponse immunitaire (Dorner et al., 2013). La diminution de la réponse immunitaire

rend alors les souris plus sensibles à l'infection par le VHC.

I.5.b.iv Souris xénotransplantées avec un foie humain.

Deux grands types de souris xénotransplantées existent : les souris ayant uniquement un foie humain et les souris ayant un foie humain mais ayant également un système immunitaire humain.

L'humanisation directe des souris par transplantation d'un foie humain offre un modèle très attractif pour l'étude des interactions du VHC avec des hépatocytes primaires humain *in vivo*. De façon physiologique, le foie est un organe quiescent et la prolifération des hépatocytes est un signal de régénération. Donc pour pouvoir réaliser ces souris chimériques, il est nécessaire qu'elles soient immunodéprimées afin de faciliter le maintien de la greffe (Boermans et al., 1992). Les souris les plus communément utilisées sont les souris SCID (SCID : « *Severe Combined ImmunoDeficiency* ») immunodéprimées (Pearson et al., 2008) génétiquement modifiées. Afin de pouvoir remplacer le foie de la souris par un foie humain, il est nécessaire dans un premier temps d'induire la mort des cellules hépatiques de souris. La technique la plus utilisée est l'expression d'un gène transgénique, l'urokinase (appelée aussi activateur du plasminogène). L'urokinase a comme substrat la forme active de la plasmine qui est le plasminogène. L'activation de la plasmine active une cascade protéolytique entraînant la dégradation des cellules hépatiques murines. Dans ces conditions, une xéno greffe de cellules hépatiques humaines est alors possible, provoquant la reconstitution d'un foie humain permissif au VHC chez la souris (Mercer et al., 2001). Différents modèles de souris ayant des foies humanisés ont été décrits (Dandri, 2001; Mercer et al., 2001; Rhim et al., 1995). Ces souris chimériques ont contribué de façon significative à une meilleure compréhension du cycle infectieux du VHC (Akazawa et al., 2013). Elles ont aussi permis l'étude d'anticorps neutralisants, la validation de certains récepteurs d'entrée virale (Lupberger et al., 2011; Sainz et al., 2012, Meuleman et al., 2012; Vercauteren et al., 2014; Desombere et al., 2016; Fauvelle et al., 2016; Prentoe et al., 2016), et l'étude de molécules ciblant différentes étapes du cycle viral comme par exemple la griffithsin (Meuleman et al., 2011).

Les souris AFC8 ont un foie et un système immunitaire humain. Afin de reconstituer le système immunitaire humain, des cellules souches hématopoïétiques sont injectées à des souris dépourvues de tout système immunitaire. Cependant, ce modèle permet l'étude du système immunitaire uniquement pendant la phase aiguë d'infection. Le renouvellement des cellules immunitaires humaines sur le long terme doit être mis au point. Ces modèles facilitent l'étude du système immunitaire humain aux différents stades de la maladie (Bility et al., 2014; Wilson et al., 2014).

Ces différents modèles d'études *in vivo* et *in vitro* ont été indispensables pour la compréhension et l'approfondissement des différentes étapes du cycle viral du VHC. Ils ont permis de mieux comprendre l'interaction hôte-pathogène lors de l'infection ainsi que la mise en place et le déroulement de la réponse immunitaire, d'évaluer différents candidats vaccins et également d'évaluer des molécules ciblant les différentes étapes du cycle viral. Le grand défi actuel est la mise en place de cellules polarisées en culture cellulaire. En effet, la polarisation cellulaire des hépatocytes a rôle crucial lors de l'infection du VHC.

1.6 Epidémiologie

1.6. a Prévalence et distribution géographique

La prévalence et le nombre d'individus infectés par le VHC ont augmenté entre 1990 et 2005 de 2,3%, passant de 122 millions à 185 millions d'individus. La prévalence de l'hépatite C est supérieure à 3,5% dans l'Est et le centre de l'Asie, en Afrique du Nord et en Afrique centrale et de l'Est. En revanche, dans le Sud et le Sud-Est de l'Asie, l'Afrique subsaharienne, la cordillère des Andes, l'Amérique centrale et du Sud, les Caraïbes, l'Océanie, l'Australie, l'Europe centrale de l'Est et de l'Ouest la prévalence est modérée : entre 1,5 et 3,5%. Tandis qu'en Asie du Pacifique, en Amérique tropicale, et en Amérique du Nord la prévalence est faible, inférieure à 1,5% (Mohd Hanafiah et al., 2013).

Chaque année, dans le monde, 54000 décès sont dus aux conséquences d'une infection par le VHC. Malheureusement, parallèlement, entre trois et quatre millions de

personnes sont nouvellement infectées. Aujourd'hui on estime que 170 millions de personnes sont chroniquement infectées (Perz et al., 2006; Thrift et al., 2017).

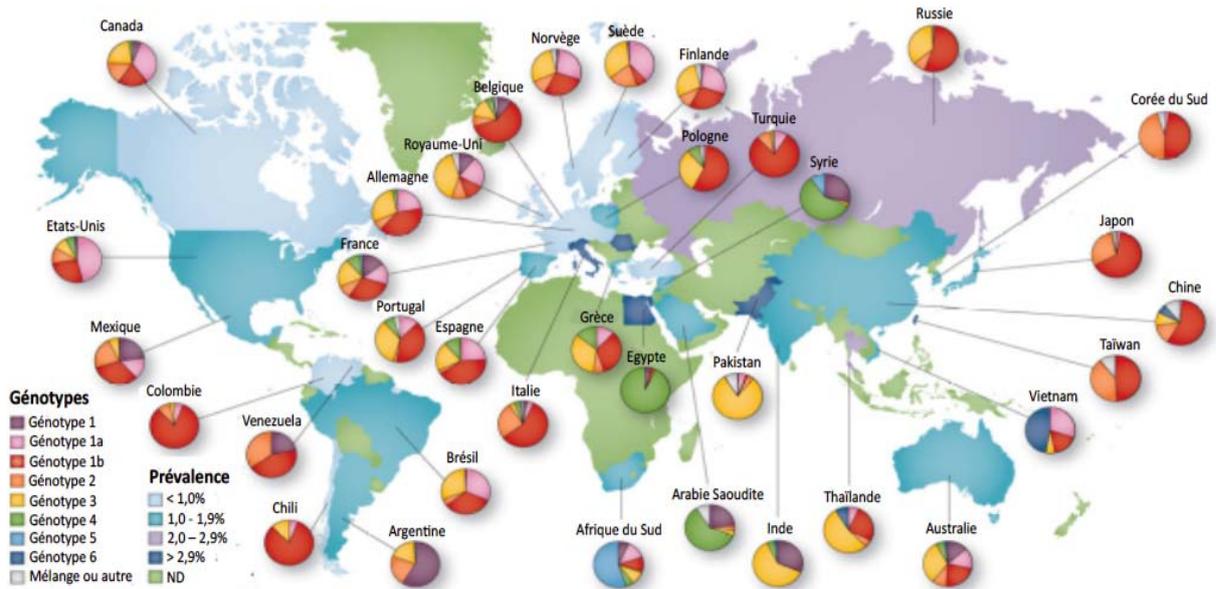


Figure 15: Diversité génétique du VHC et variabilité des prévalences dans les continents (D'après Hajarizadeh et al., 2013)

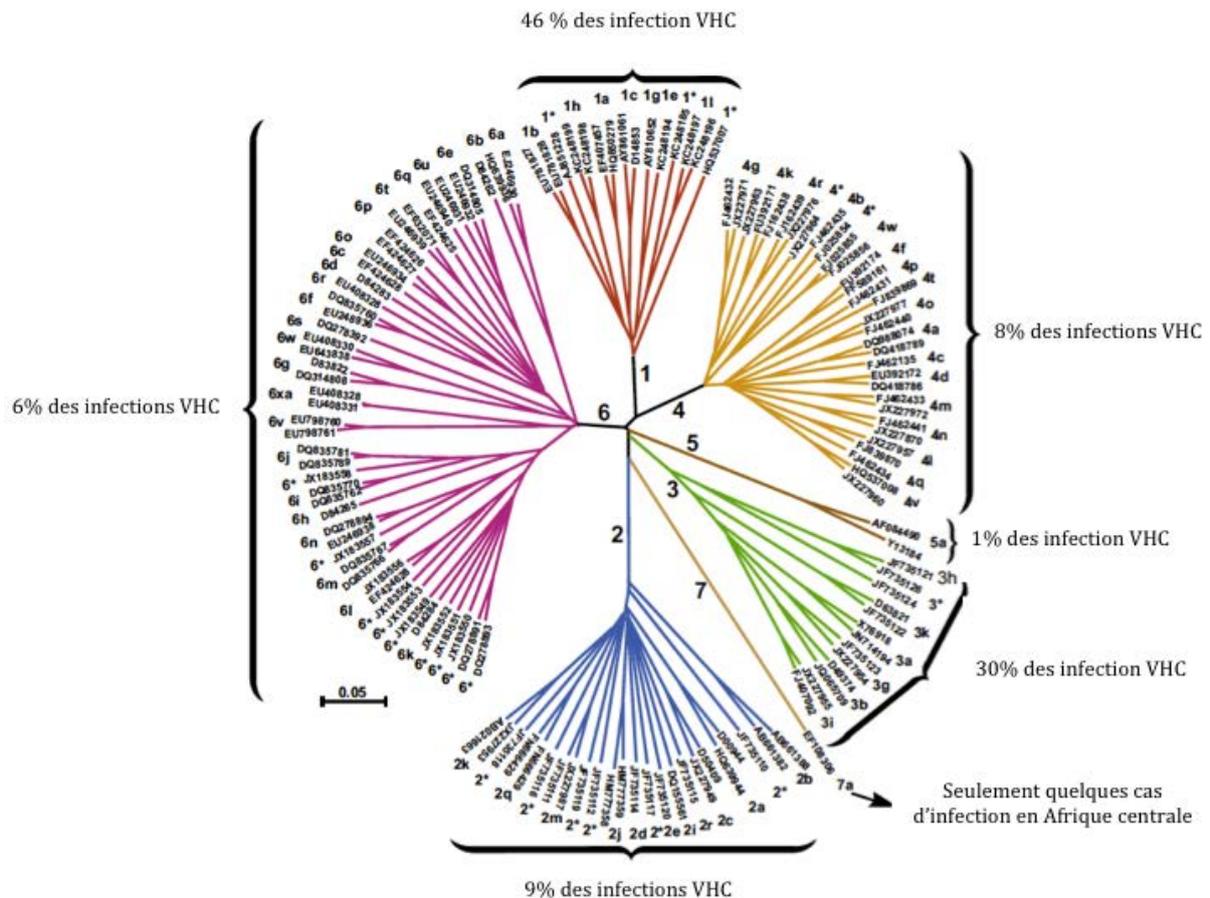


Figure 16 : Répartition des différents génotypes et sous-types du VHC (D'après Bukh 2016)

1.6. b Hétérogénéité génétique et évolution moléculaire

Le VHC a la caractéristique d'être d'une grande hétérogénéité génétique (Figure 15). En effet, sept génotypes majoritaires sont connus (de 1 à 7) mais également plusieurs sous-types au sein de chaque génotype (Smith et al., 2014). La variabilité nucléotidique entre les différents génotypes du VHC est d'environ 30% alors que la variabilité entre les sous-types est de 15%. Les génotypes du VHC sont caractérisés par une distribution géographique différente (Figure 16). En effet, les génotypes 1, 2 et 3 sont présents partout dans le monde. En revanche en Afrique de l'Ouest sont présents uniquement les génotypes 1 et 2 alors que sur le sous continent indien n'est présent que le génotype 3. Les génotypes 4 et 5 sont principalement retrouvés en Afrique et le génotype 4 est fortement présent en Egypte (Frank et al., 2000) et en Afrique centrale. Le génotype 6 est principalement retrouvé en Asie (Lavanchy, 2011). La distribution génétique du VHC peut s'expliquer en partie par le fait que le génotype 2 est d'une lignée

génétique plus ancienne que les génotypes 3, 5 et 6, alors que les génotypes 1 et 4 ont émergé plus récemment.

Cette grande diversité génétique est due à une évolution moléculaire du génome viral du VHC incluant différents mécanismes tels que l'insertion de mutation, la dérive génétique ou encore les recombinaisons.

1.6. b. i Insertion de mutation

L'insertion de mutations dans le génome par la RdRp, qui ne possède pas de fonction exonucléase comme les ADN polymérases, est le premier élément contribuant à la haute variabilité génétique du VHC (Ribeiro et al., 2012). La probabilité d'erreur par nucléotide de la RdRp est comprise entre 10^{-4} et 10^{-5} . Cependant, le nombre élevé de virions présents chez les individus chroniquement infectés (environ 10^{12}) explique en grande partie la présence de quasi-espèces virales. La variabilité en aa entre les différents génotypes du VHC a un rôle important lors de l'infection. Par exemple, elle affecte l'efficacité de la protéase NS3/4A. Les différences fonctionnelles observées entre les différents variants du VHC peuvent affecter la réplication virale (Franco et al., 2007).

1.6. b. ii Dérive génétique

La dérive génétique correspond à une fluctuation dans la fréquence des différents variants d'une population virale (Kaito et al., 1994) ; c'est un phénomène impossible à prévoir. Ce mécanisme majeur de l'évolution est d'autant plus important lorsque la population virale est petite. Ceci peut également expliquer la grande hétérogénéité des variants trouvés chez les patients ayant une infection chronique par le VHC, en comparaison au nombre beaucoup plus faible de variants chez les patients étant dans la phase aigüe de l'infection (Allain et al., 2000).

1.6. b. iii Recombinaison

La recombinaison génétique est un autre mécanisme participant à l'hétérogénéité génétique du VHC. La recombinaison génétique consiste en un réarrangement

génomique durant l'élongation de l'ARN. La RdRp permute les protéines virales provenant du virus donneur et du virus accepteur, permettant ainsi l'apparition d'un ARN viral provenant de deux virus « parents » (Worobey and Holmes, 1999). Pour que ce phénomène ait lieu, il faut que deux virus infectent la même cellule (Gonzalez-Candelas et al., 2011) : cet événement est considéré comme rare (Shi et al., 2012).

I.6. c Mode de transmission

La source d'infection du VHC est essentiellement sanguine. Actuellement en France, le risque d'être infecté par le VHC lors de transfusion sanguine est très faible. Dans les pays où les conditions sanitaires ne sont pas aussi réglementées que dans les pays développés, certaines personnes ont été infectées lors de la réalisation de tatouages, de piercings, d'acupuncture ou d'actes médicaux avec du matériel non stérile (Hajarizadeh et al., 2013).

Aujourd'hui, le risque d'être infecté par le VHC au sein de la communauté toxicomane est élevé, plus particulièrement chez les personnes utilisant des injections de drogues par voie intraveineuse. Les consommateurs de cocaïne se transmettent également le virus par l'intermédiaire des pailles partagées utilisées pour l'inhalation de la drogue (Nelson et al., 2011). Cependant aujourd'hui, la prise en charge et le suivi des toxicomanes, notamment par la mise à disposition de matériel stérile, permet de diminuer les contaminations. La transmission sexuelle du VHC a également été observée pour les personnes ayant des activités hétérosexuelles et homosexuelles avec de multiples partenaires (Bruggmann et al., 2014; Hajarizadeh et al., 2013; Jin et al., 2016). Des cas de transmission mère à enfant ont aussi été observés lors des naissances par des mères porteuses du VHC dans 4 à 7% des cas (Roberts and Yeung, 2002).

La majorité des patients toxicomanes sont chroniquement infectés depuis plusieurs années et continuent d'être exposés à de nouvelles infections par le VHC.

I.7 Description de l'hépatite C

Dans un grand nombre de cas, l'infection par le VHC chez les patients est diagnostiquée tardivement, notamment lors de l'apparition des formes sévères de la

maladie. L'hépatite C est une maladie qui évolue lentement, pouvant s'étendre sur 20 à 30 ans (Figure 17). Lors d'une exposition au VHC, la première phase d'infection est asymptomatique, et est suivie d'une phase aiguë. Dans 70% des cas, la phase aiguë évolue à un stade chronique. L'évolution lente de la maladie entraîne une inflammation persistante du foie, responsable des dérégulations des fonctions de cet organe. Ces dérégulations engendrent l'apparition de fibrose, de cirrhose du foie et d'insuffisance hépatique (Bataller and Brenner, 2005). Dans les cas les plus graves, l'hépatite chronique peut dégénérer en hépatocarcinome (Tong et al., 1995; Wiese et al., 2000).

I.7.a Hépatite aiguë

Dans 80% des cas, l'hépatite C aiguë est asymptomatique et par conséquent ce stade d'infection est rarement diagnostiqué. Chronologiquement, on parle d'hépatite aiguë après une infection datant de plus de 7 semaines mais avec une persistance de l'ARN viral de moins 6 mois (Thimme et al., 2001). A ce stade, une augmentation des transaminases hépatiques (ALAT: Alanine Amino Transférase et ASAT: Aspartate Amino Transférase) (Cox et al., 2005) est observée avec un taux 10 fois supérieur au

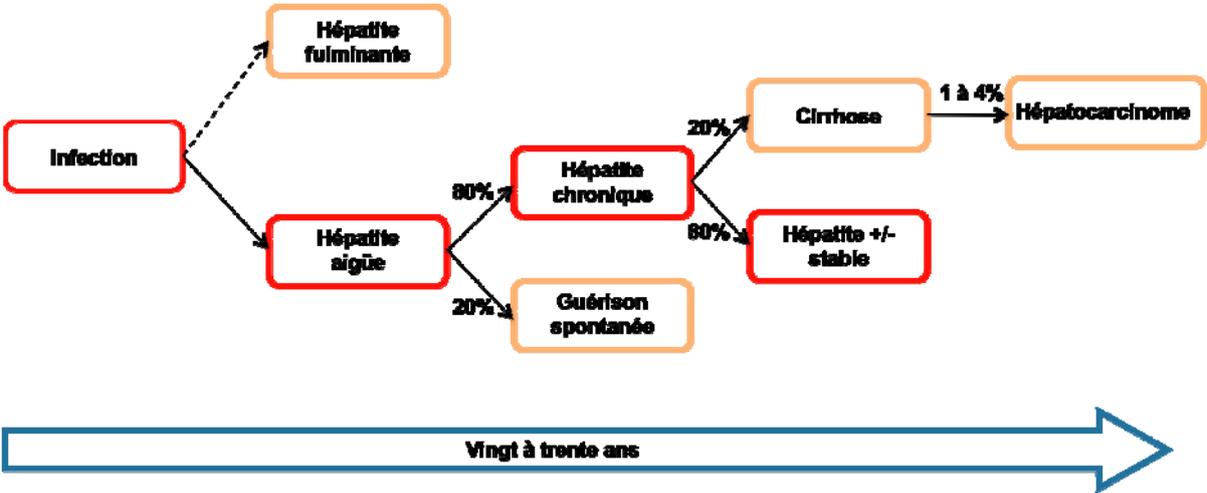


Figure 17: Evolution d'une hépatite C causée par le VHC

seuil normal. Après 10 à 12 semaines d'infection, les symptômes classiquement observés lors d'hépatite virale apparaissent : des jaunisses chez un tiers des patients, des urines foncées, une anorexie, une aversion à fumer pour les fumeurs, et un inconfort abdominal (Alric et al., 1997; Grebely et al., 2014). Des microlésions peuvent être également observées sur le foie des patients (Haydon et al., 1998).

Il est remarqué que 15 à 40% des patients ayant une hépatite aiguë guérissent spontanément : mais le temps de clairance du VHC n'est pas connu. Différents facteurs génétiques et environnementaux peuvent influencer la guérison d'une hépatite aiguë : la réponse immunitaire de l'hôte, le mode d'acquisition du virus, la sévérité de l'hépatite aiguë, l'apparition de jaunisse, l'immunosuppression du patient (dû à un traitement avec des corticostéroïdes par exemple), ou encore des co-infections avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Il y a un risque de réinfection après la clairance spontanée du VHC, malgré la présence d'anticorps. De hauts taux de réinfection ont été observés pour les hommes VIH positifs ayant des pratiques homosexuelles (van de Laar et al., 2010 ; Bailony et al., 2013 ; Antonello et al., 2016). Chez ces patients, lors de la détection des anticorps anti-VHC, un criblage est réalisé afin de confirmer la réinfection par le VHC (Taylor et al., 2014).

Après plus de 6 mois de persistance de l'ARN viral dans le sang, la maladie est définie comme chronique (Desmet et al., 1994).

I.7. b Hépatite chronique

L'hépatite chronique est un syndrome clinique et pathologique caractérisé par différents degrés de nécrose et d'inflammation hépatocellulaire. L'infection évolue lentement, entraînant une inflammation persistante du foie. Cette inflammation provoque des lésions du foie caractérisées par des foyers de nécrose parenchymateux. La sévérité de l'hépatite chronique peut être affectée par plusieurs facteurs : l'âge, le genre, l'ethnicité et le développement de jaunisse pendant la phase aiguë.

Les hépatites chroniques apparaissent peu chez les individus jeunes. En effet, il a été démontré qu'uniquement 30% des individus de moins de 20 ans vont voir leur hépatite aiguë progresser à un stade chronique, alors que c'est le cas chez 76% des individus de plus de 20 ans (Alter et al., 1999). De manière intéressante, le taux d'hépatite chronique apparaît plus faible chez les femmes, notamment chez les jeunes femmes. En Irlande, parmi les femmes de 17 ans auxquelles on a administré de l'immunoglobuline D contaminée, 55% d'entre elles ont développé une hépatite chronique (Kenny-Walsh, 1999). Dans les mêmes conditions, en Allemagne, 55% des femmes de 20 ans ont développé une chronicité (Wiese et al., 2000). Ces taux sont à comparer avec ceux de la population générale où l'on observe dans 70% des cas le développement d'une hépatite chronique. Des différences dans les taux d'hépatite chronique, la réponse aux traitements et le développement de complications des individus exposés au VHC sont aussi observées en fonction des ethnies. Pour des raisons encore inconnues, les Africains et les Américains ont des taux d'hépatite chronique plus élevés que les Caucasiens et les Latino-américains (Seeff, 2001; Villano et al., 1999). De manière surprenante, le taux d'hépatite C chronique est plus faible chez les patients ayant développé une jaunisse durant leur phase d'hépatite aiguë. En effet, chez 142 patients toxicomanes infectés par le VHC, ceux qui présentent une clairance virale ont eu les symptômes d'une jaunisse durant la phase aiguë de l'hépatite (Villano et al., 1999). Cette caractéristique a également été observée chez les femmes enceintes à qui l'on a injecté de l'immunoglobuline D contaminée par le VHC avant 1990. Uniquement 43% des femmes ayant eu une jaunisse développent une hépatite chronique contre 60% des femmes qui n'ont pas eu de jaunisse durant la phase aiguë. Il a été émis comme hypothèse que la jaunisse pouvait être liée à une réponse immunitaire plus robuste (Grüner et al., 2000).

I.7.c Fibrose

La fibrose du foie se caractérise par un excédent de protéine de la matrice extracellulaire à proximité de l'organe. Ceci est le reflet d'une réaction inflammatoire persistante (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Le développement d'une fibrose lors d'une hépatite C est multifactoriel (Datz et al., 1999; Yi et al., 2004).

La consommation d'alcool est l'un des principaux facteurs influençant la progression de la fibrose lorsqu'on est infecté par le VHC (Poynard et al., 1997; Wiley et al., 1998). Une personne qui consomme beaucoup d'alcool a un risque élevé de développer une cirrhose en comparaison avec une personne qui ne consomme pas ou peu d'alcool. Les effets néfastes de l'alcool sont observés à partir d'une consommation de 30g /jour pour les hommes et de 20g /jour pour les femmes (Consensus management Hepatitis C 2002). Le stade de fibrose est également significativement plus élevé pour les individus qui sont infectés après leurs 40 ans, que pour ceux infectés plus tôt (Poynard et al., 1997). Un autre facteur influençant le développement de la fibrose est la présence de co-infections par le VIH et le VHB. Les individus toxicomanes et hémophiles sont particulièrement touchés par les co-infections (Benitez et al., 2015). En général, les individus VIH positif ont de faibles taux de lymphocytes T CD4, ce qui accélère la fibrose du foie (Di Martino, 2001; Mendes-Correa et al., 2005; Bhagani 2009).

I.7.d Cirrhose et carcinome hépatocellulaire

La progression de la cirrhose est cliniquement silencieuse et parfois détectée tardivement chez certains patients, notamment lors de l'apparition de complications telles que des hépatocarcinomes. Chez les patients souffrant d'hépatite chronique, le développement d'une cirrhose est observé dans 10 à 15% des cas (Fattovich et al., 1997). Lorsque le stade cirrhotique est atteint, l'évolution de la maladie ne peut plus être prédit. La cirrhose peut être stagnante pendant plusieurs années puis évoluer progressivement dans 1 à 5% des cas vers un hépatocarcinome (Hu and Tong, 1999) (Saito et al., 1990), entraînant une décompensation hépatique dans 3 à 6% des cas. Après l'épisode de décompensation, le décès du patient au cours de l'année est observé dans 15 à 20% des cas. Le temps d'évolution depuis l'infection par le VHC jusqu'au stade cirrhotique est multifactoriel et est propre à chaque patient.

L'immunosuppression est associée avec les formes les plus agressives de maladie du foie. Les patients déficients en immunoglobuline ou ayant une déficience immunitaire cellulaire ont des taux de progression de la cirrhose plus importants que les patients immunocompétents (Benhamou et al., 1999; Berenguer et al., 2000; Bjoro et al., 1994).

L'insulino-résistance est également associée à une détérioration du foie ainsi qu'à une faible réponse aux traitements (D'Souza et al., 2005).

I.7.d Manifestations extra-hépatiques

Une infection chronique du VHC peut entraîner des manifestations cliniques extra-hépatiques. Ces manifestations incluent de nombreux systèmes organiques, rénaux, dermatologiques, hématologiques et rhumatologiques. La plus commune des manifestations extra-hépatiques est la cryoglobulinémie. Les protéines nommées cryoglobulines sont retrouvées dans le sang des patients et peuvent précipiter à des températures inférieures à 37°C. Ces protéines sont trouvées chez 50% des patients ayant une infection chronique du VHC (El-Serag et al., 2002). Ce symptôme peut être dû à une activation chronique du système immunitaire et à l'utilisation d'IFN lors des traitements. Il est aussi parfois observé des syndromes lymphoprolifératifs, des fibroses pulmonaires, ou encore de l'ostéosclérose (Chen and Li, 2006).

I.8 Diagnostic VHC

L'objectif du diagnostic viral est d'identifier les personnes infectées par le VHC pour ensuite les traiter. Ce diagnostic permet également de limiter la progression de la maladie et la propagation du virus. La plupart des patients infectés par le VHC présentent une première phase d'infection asymptomatique. Le diagnostic s'effectue le plus souvent lorsque les patients souffrent des symptômes d'hépatite virale classiquement décrits, lors de la palpation du foie au cours d'une visite médicale, lors du dosage des transaminases hépatiques dans le sang, ou encore lors d'une biopsie du foie. Différentes méthodes ont été mises en place pour diagnostiquer les infections par le VHC.

Plusieurs méthodes de diagnostic direct et indirect du VHC sont disponibles aujourd'hui. Parmi les tests indirects, le test sérologique ELISA (ELISA : « *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* ») est le plus communément utilisé et est peu coûteux. Il permet de détecter des anticorps anti-VHC dirigés contre les régions conservées des protéines

core, NS3, NS4A et les régions NS5A, dans le sérum des patients. La sensibilité des tests ELISA de troisième génération est de 98,9% et leur spécificité est de 100% pour les patients atteints d'hépatite chronique (Colin et al., 2001). Cependant, les anticorps sont détectables à partir de 40 jours après l'infection avec ces tests ELISA. Avec les outils de 4^{ème} génération, la détection des anticorps peut avoir lieu plus tôt. Ce test ELISA ne peut pas être réalisé sur les enfants de moins de 18 mois, car il y a un risque de réaction croisée avec les anticorps maternels (Mack et al., 2012). Des tests rapides de détection d'anticorps peuvent également être mis en place, « OraQuick HCV Rapid Antibody » (Ora Sure Technologies, Bethlehem, PA). Ce test a une grande sensibilité et une bonne spécificité (Shivkumar et al., 2012). Il peut être utilisé sur toutes les personnes de plus de 15 ans susceptibles d'être infectées par le VHC (Lee et al., 2011). Il permet de détecter des anticorps anti-VHC dirigés contre la protéine core dans le sang total, le plasma, le sérum ou le fluide oral.

Les tests directs vont détecter et quantifier les différents composants de la particule virale. L'ARN viral va être rétrotranscrit en ADNc puis amplifié et quantifié par RT-PCR (RT-PCR : « *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* »). La réalisation d'un test ELISA permettant de détecter les antigènes de la protéine core corrélé avec la quantification de l'ARN viral par RT-PCR permet de détecter spécifiquement le VHC (Moscato et al., 2011; Albertoni et al., 2014).

La détermination du génotype viral du patient est un critère essentiel pour la détermination de la thérapie antivirale administrée par la suite. Pour identifier le génotype d'un patient il est possible de séquencer le génome viral en ciblant une région donnée. L'amplification par PCR du génome viral peut être réalisée en utilisant un couple d'amorces spécifiques des différents génotypes (Chevaliez and Pawlotsky, 2012).

I.9 Mise en place d'un traitement

Après confirmation que l'hépatite C du patient a atteint un stade chronique, des tests physiques pour évaluer l'état du foie et les manifestations extrahépatiques sont réalisés. Les tests de routine sont effectués en laboratoire pour déterminer le stade d'avancement de la maladie : en effet le niveau de fibrose du foie va déterminer le traitement à suivre. L'évaluation des facteurs de risques de co-infections et de comorbidités VHC est également réalisée. Après 4 semaines et 12 semaines de

traitement, le niveau d'ARN viral chez les patients est quantifié afin d'évaluer l'efficacité du traitement et éventuellement de compléter la thérapie. Les patients ayant une fibrose ou une cirrhose à un stade avancé sont sous surveillance endoscopique afin de détecter l'apparition de carcinome hépatocellulaire.

Le rôle des traitements contre le VHC est d'essayer d'éradiquer le virus de l'hôte. La réponse virologique soutenue (SVR : « *sustained viral response* ») est définie lorsque l'on ne détecte plus d'ARN dans le sang du patient après 12 semaines de traitement ou à la fin du traitement. L'apparition de la SVR permet de prévenir le développement de cirrhose ainsi que d'autres complications. Chez les patients ayant une cirrhose, la SVR permet alors de réduire le risque de décompensation cirrhotique et de carcinome hépatocellulaire, ainsi que le décès (Asselah 2011; Naggie, 2012; Naggie and Muir, 2016).

25 ans après la découverte du VHC des molécules antivirales ciblant directement le VHC ont été mises sur le marché, pouvant guérir près de 90% des patients quel que soit le génotype du virus. Afin d'arriver à ce résultat, 25 ans de recherche ont été nécessaires.

I.9.a Mise en place d'une bithérapie

I.9.a.i IFN- α

A l'époque de la découverte du virus NANB, les patients infectés par le VHB étaient traités avec de l'IFN. Cette molécule permet de renforcer la réponse immunitaire de l'hôte lors de l'infection virale et stimule les cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée et adaptative. L'IFN se trouvait donc être un candidat intéressant pour lutter contre ce virus, même si cette molécule n'est pas spécifique du virus. En 1986, des études pilotes utilisant cette molécule en mono-thérapie ont été mises en place pour lutter contre le virus NANB (Hoofnagle et al., 1986). Des résultats impressionnants ont été observés, notamment par une diminution des transaminases dans le sérum des patients et un retour à la normale après 16 semaines de traitement. Plus tard, il a été mis en évidence que la diminution des transaminases est liée à une

diminution des ARN viraux présents chez les patients (Shindo et al., 1991). Les essais cliniques préconisaient 24 semaines de traitements avec l'IFN. Puis en 1989, après l'identification du VHC, l'IFN- α a été administré aux patients ayant des niveaux de transaminases élevés dans le sang. Cependant l'efficacité de ce traitement était faible, entre 15 et 20%, (Poynard et al., 1995) et des effets secondaires très importants apparaissaient rapidement, tels que dépression, fatigue, céphalées, convulsions et vertiges (Gomez-Rubio et al., 1990). Dans ces conditions, les temps de traitements avec l'IFN- α ont été adaptés à chaque génotype viral dans l'objectif d'avoir une diminution de la charge virale efficace et plus spécifique.

I.9.a.ii IFN- α et ribavirine

Dans ce contexte, au cours des années 1990, une équipe suédoise et une équipe italienne ont l'idée de combiner à l'IFN- α de la ribavirine, administrée de façon orale auprès de 10 patients. La principale hypothèse est que cette molécule agirait comme un analogue de la guanosine, inhibant ainsi la réplication virale (Pawlotsky et al., 2004; Feld et al., 2005). Les effets spectaculaires observés simultanément par ces deux équipes (Schalm et al., 1997; Schvarcz et al., 1995) permettent de commencer les premiers essais cliniques à plus grande échelle combinant IFN- α et ribavirine chez les patients atteints d'hépatite C chronique.

Au cours de plusieurs études cliniques, uniquement les patients non-répondeurs à l'IFN- α seul reçoivent soit l'IFN- α seul soit l'IFN- α combiné avec la ribavirine pendant 24 semaines. 40% des patients inclus dans ces études acquièrent une SVR lorsqu'on leur administre la combinaison IFN- α et ribavirine (Gitnick, 1998)(Brillanti et al., 1994; Gitnick, 1998). Cette combinaison, IFN- α et ribavirine, est administrée à partir de 1999 lors des traitements de base de l'hépatite C chronique (Ahmed and Keeffe, 1999).

I.9.a.iii PolyÉthylène Glycol -IFN- α (PEG-IFN- α) et ribavirine

Lors du traitement combinant l'IFN- α et la ribavirine, deux phases de diminution virale dues à l'IFN- α sont observées. La première phase, rapide, est dose-dépendante et est le reflet direct du blocage de la réplication du VHC. La seconde phase, plus lente,

résulte de la clairance des cellules infectées dans un contexte de blocage de la production de VHC. La ribavirine n'a pas d'effet lors de la première phase de déclin mais accélère significativement la seconde phase, expliquant les importants taux de guérisons des patients traités avec cette bithérapie (Neumann et al., 1998). L'optimisation de l'action de l'IFN- α lors de la première phase peut être intéressante notamment pour essayer de diminuer sa vitesse d'élimination.

L'IFN- α est combiné à une molécule de PEG-IFN- α permettant de diminuer significativement sa vitesse de dégradation. Dans ce contexte deux molécules de PEG-IFN- α ont été développées : (1) PEG-IFN- α 2a lié à une molécule de PEG de 40KD et (2) le PEG-IFN- α 2b lié à une molécule de 12 KD (McHutchison et al., 1998). La demi-vie de ces deux molécules est alors respectivement de 75h et 30h. Ces deux PEG-IFN- α permettent d'avoir plusieurs stratégies de traitement, dépendantes du génotype viral du patient. Les patients infectés par le génotype viral 1 du VHC auront 48 semaines de traitement et seront traités avec le PEG-IFN- α 2b, tandis que pour les patients infectés par les génotypes 2 et 3, le temps de traitement est de 24 semaines avec le PEG-IFN- α 2a. Dans la majorité des cas, l'addition de PEG-IFN- α et de ribavirine permet d'augmenter la SVR des patients de 42 à 46% pour les patients infectés par le génotype 1 et entre 76 et 82% pour les patients infectés par les génotypes 2 et 3 (Herrmann, 2003; Zeuzem et al., 2000, 2001).

L'étape suivante, dans la prise en charge des patients, est de chercher à caractériser le plus spécifiquement possible la réponse virologique des patients en fonction des traitements administrés. Ceci ayant pour but de tendre vers des traitements spécifiques en fonction des patients et de limiter ainsi les effets secondaires.

I.9.b Les molécules ciblant directement le VHC

Parallèlement à la découverte du VHC, de nombreux outils ont été développés en culture cellulaire permettant l'approfondissement des connaissances sur le cycle viral, comme le réplicon subgénomique, les VHCpp et les VHCcc (voir I.5). Ces différents systèmes ont permis l'identification de nombreux inhibiteurs du VHC appelés antiviraux à action directe (« Direct acting antivirals », DAAs) (Figure 18). Le cycle viral peut être ciblé par les DAAs à de multiples étapes, mais l'étape de réplication est la plus

intéressante : par conséquent de nombreuses molécules ciblant directement le virus lors de cette étape ont été développées. Ces DAAs comprennent des inhibiteurs de la protéase virale NS3-4A, des inhibiteurs de NS5A et également des analogues nucléotidiques (ou non) de la RdRp. Ces molécules diffèrent par leurs activités contre le VHC mais aussi par leur barrière de résistance. Le développement de molécules inhibitrices du VHC ayant pour cible la cellule hôte a également été entrepris. Cependant, de multiples agents très prometteurs ont dû être abandonnés à cause de leur grande toxicité et de l'observation de complications fatales chez un petit nombre de patients (Figure 19).

I.9.b.i Inhibiteurs de la protéase NS3-4A

Les inhibiteurs de la protéase NS3-4A lient le site catalytique de l'enzyme et bloquent le processus post-traductionnel de la polyprotéine virale.

Le premier inhibiteur de la protéase NS3-4A à avoir été testé chez les patients est le ciluprévir (BILN 2061). Cette molécule est un peptidomimétique, se liant de manière non covalente au site actif de la protéase (Lamarre et al., 2003). Le ciluprévir, administré en monothérapie, provoquait une diminution rapide des ARN viraux dans le sérum des patients infectés par le génotype 1. Cependant le développement de cette molécule a dû être arrêté à la suite de cas de cardiotoxicité.

La première génération d'inhibiteurs de la protéase NS3-4A à avoir été commercialisés en Mai 2011 sont le telaprévir par Merck, (Jacobson et al., 2011) et le boceprévir, par Vertex Pharmaceuticals, (Poordad et al., 2011). Ces deux molécules appartiennent au groupe des α -ketonamide. Le telaprévir inhibe de manière covalente et irréversible la protéase NS3-4A (Zeuzem et al., 2001) tandis que le boceprévir est un peptidomimétique qui inhibe la protéase NS3-4A par un complexe covalent mais réversible (Poordad et al., 2011). Le telaprévir ou le boceprévir ont été administrés aux patients infectés par le génotype 1 du VHC en combinaison avec le PEG-IFN α et la ribavirine de 2011 à 2013 (Bacon et al., 2011). Cette première génération d'inhibiteur de NS3-4A a permis des avancées significatives dans les traitements améliorant la SVR de 60 à 75%. Cependant, des effets secondaires importants ont été observés chez les

patients, comme des d'anémies, des éruptions cutanées ainsi que des symptômes gastro-intestinaux. De plus, l'apparition de virus résistants lors de ces traitements et la disponibilité des nouveaux DAAs ont entraîné l'élimination de ces deux molécules des thérapies actuelles (Naggie, 2012)(Hézode et al., 2013).

La seconde vague des inhibiteurs de la protéase NS3-4A, a une activité pangénotypique, une barrière de résistance modérée et est mieux tolérée par les patients (Jacobson et al., 2014). Ces propriétés permettent de diminuer la durée des traitements passant alors de 48 semaines à 24 ou 12 semaines. Certaines molécules sont déjà commercialisées comme par exemple le simeprevir et le paritaprevir, tandis que d'autres molécules sont en phase d'essais clinique II et III comme l'asunaprevir, le danoprevir et le vaniprevir. Une seconde génération d'inhibiteur de la protéase NS3-4A a été développée dont le grazoprevir, et ces inhibiteurs ont une haute barrière de résistance.

Le simeprevir (Raboisson et al., 2008), commercialisé par Janssen Pharmaceuticals fin 2013, est un inhibiteur pangénotypique de la protéase NS3/4A. Cette molécule est administrée en combinaison avec soit le PEG-IFN α /ribavirine ou soit un inhibiteur de NS5B, le sofosbuvir, chez les patients infectés par le génotype 1 du VHC (1b>1a) et est en cours d'essai chez les patients infectés par le génotype 4 (Degré et al., 2017). Cette molécule est bien tolérée chez les patients et leur SVR peut augmenter jusqu'à 80% (Rosenquist et al., 2014). Cependant l'efficacité du traitement est moins élevée chez les patients infectés par le génotype 1a ayant le polymorphisme (Q80K) dans NS3 qu'avec le génotype 1b (Ouwerkerk-Mahadevan et al., 2016; Sanford, 2015).

Le paritaprevir (Pilot-Matias et al., 2015) est administré couramment en combinaison avec un inhibiteur de NS5A, l'ombitasvir, un inhibiteur de NS5B, le dasabuvir et le ritonavir qui est un inhibiteur des cytochromes P450 3A4. Ces quatre molécules font partie d'une combinaison « Viekira pak » commercialisée par AbbVie qui a été approuvée en décembre 2014. Cette combinaison est efficace contre les génotypes 1, 2, 3, 4 et 6 du VHC (Sulkowski et al., 2015b; Menon et al., 2015).

Le grazoprevir (Summa et al., 2012) est un inhibiteur de seconde génération de la protéase NS3/4A développé par Merck. Cette molécule est active contre tous les génotypes du VHC et a une barrière de résistance élevée. Le grazoprevir est administré

en combinaison avec un inhibiteur de NS5A, l'elbasvir, contre les géotypes 1 et 4 du VHC (Boyd et al., 2017) et une SVR de 90% est observé pour le géotype 1 (Summa et al., 2012).

Parmi la seconde vague d'inhibiteurs de protéase NS3-4A de première génération, l'asunaprevir et le vaniprevir sont toutes les deux en phase d'essais clinique III (Koklu et al., 2017, Kumada et al., 2016). D'autres molécules sont en phase clinique d'évaluation, comme le le danoprevir (Deutsch and Papatheodoridis, 2010), ou le GS-9256 (Zeuzem et al., 2012).

L'asunaprevir (Pasquinelli et al., 2012; Scola et al., 2014) est développé par Bristol-Myers Squib. Cette molécule est active contre les géotypes 1, 2, 3, 4, 5 et 6 du VHC. Au cours des essais cliniques, l'asunaprevir est administré en combinaison avec le daclatasvir dans le cas d'hépatite C chronique. Cette combinaison permet d'obtenir des SVR élevées chez les patients ayant développé une cirrhose du foie (Hagiwara et al., 2016).

Le vaniprevir (Liverton et al., 2010), commercialisée par Merck fin 2014 est administré chez les patients ayant un géotype viral de type 1. Cette molécule augmente de manière significative la SVR chez les patients en combinaison avec l'IFN α . Mais l'objectif des nouvelles thérapies en Europe est de s'affranchir de l'IFN α , et des effets secondaires associés. Par conséquent cette molécule est peu utilisée et uniquement commercialisée au Japon (Lawitz et al., 2013).

I.9.b.ii Inhibiteur de NS5A

Les inhibiteurs de la protéine NS5A lie le domaine 1 de la protéine causant une déformation structurale interférant avec les fonctions de la protéine et inhibant ainsi la réplication virale et l'assemblage des virions (Gao et al., 2010; Guedj et al., 2013). Ces inhibiteurs de première génération de NS5A sont le daclatasvir, le ledipasvir, et l'ombitasvir. Ces molécules ont une barrière de résistance modérée et sont principalement actives contre le géotype 1.

Le daclatasvir (Wang et al., 2012) est commercialisé par Bristol Myers Squib. Cette molécules est principalement active contre le géotype 1 VHC (Fridell et al., 2011). Le daclatasvir est bien supporté par les patients, les effets secondaires les plus

communément observés étant des maux de tête et de la fatigue (Rey et al., 2016). Le daclatasvir est toujours administré en combinaison avec soit un inhibiteur de NS5B : le sofosbuvir (Sulkowski et al 2014) ou soit un inhibiteur de la protéase NS3-4A : l'asunaprevir (Lee et al., 2013).

Le ledipasvir (Link et al., 2014) a été commercialisée par Gilead Sciences en octobre 2014. Cette molécule réduit l'activité antivirale du VHC de génotype 1. Elle est administrée en combinaison avec le sofosbuvir, permettant alors d'atteindre des taux de SVR entre 93 et 99% après 12 semaines de thérapies.

L'ombitasvir (Krishnan et al., 2015) fait partie du Viekira pak. Cette molécule pangénotypique inhibe très fortement le VHC avec des concentrations de l'ordre du picomolaire. Son activité en monothérapie a été démontrée comme réduisant les taux d'infection de 3,1 log₁₀ (Krishnan et al., 2015).

Le velpatasvir (Cheng et al., 2013) est un inhibiteur de NS5A de seconde génération. Cette molécule est administrée en combinaison avec le sofosbuvir pour le traitement des adultes ayant une hépatite chronique tous génotypes confondus. Cette combinaison a été approuvée par la FDA au Etats-Unis mais aussi par l'agence européenne des médicaments en octobre 2016 (Nehra et al., 2017).

L'elbasvir est également un inhibiteur de NS5A de seconde génération (Lawitz et al., 2015) qui est administré en combinaison avec le grazoprevir. Cette molécule est active contre les génotypes 1, 2, 3 et 4 du VHC. Cette combinaison administrée avec de la ribavirine permet d'obtenir une SVR de 93% pour le VHC en mono-infection et de 98 % lors de la co-infection avec le VIH (Sulkowski et al., 2015a; Alric et al., 2016).

I.9.b.iii Inhibiteur de la RdRp NS5B

Les inhibiteurs de la RdRp NS5B peuvent être classés en deux catégories : les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non-nucléosidiques.

Les inhibiteurs agissant comme des analogues nucléosidiques, s'incorporent dans la chaîne d'ARN et agissent comme des agents terminaux de la polymérisation. Ces inhibiteurs sont actifs contre tous les génotypes de VHC car le centre actif de NS5B est conservé d'un génotype à l'autre. De plus, ces inhibiteurs nucléosidiques ont une grande barrière de résistance. La valopicitabine est le premier inhibiteur nucléosidique à avoir

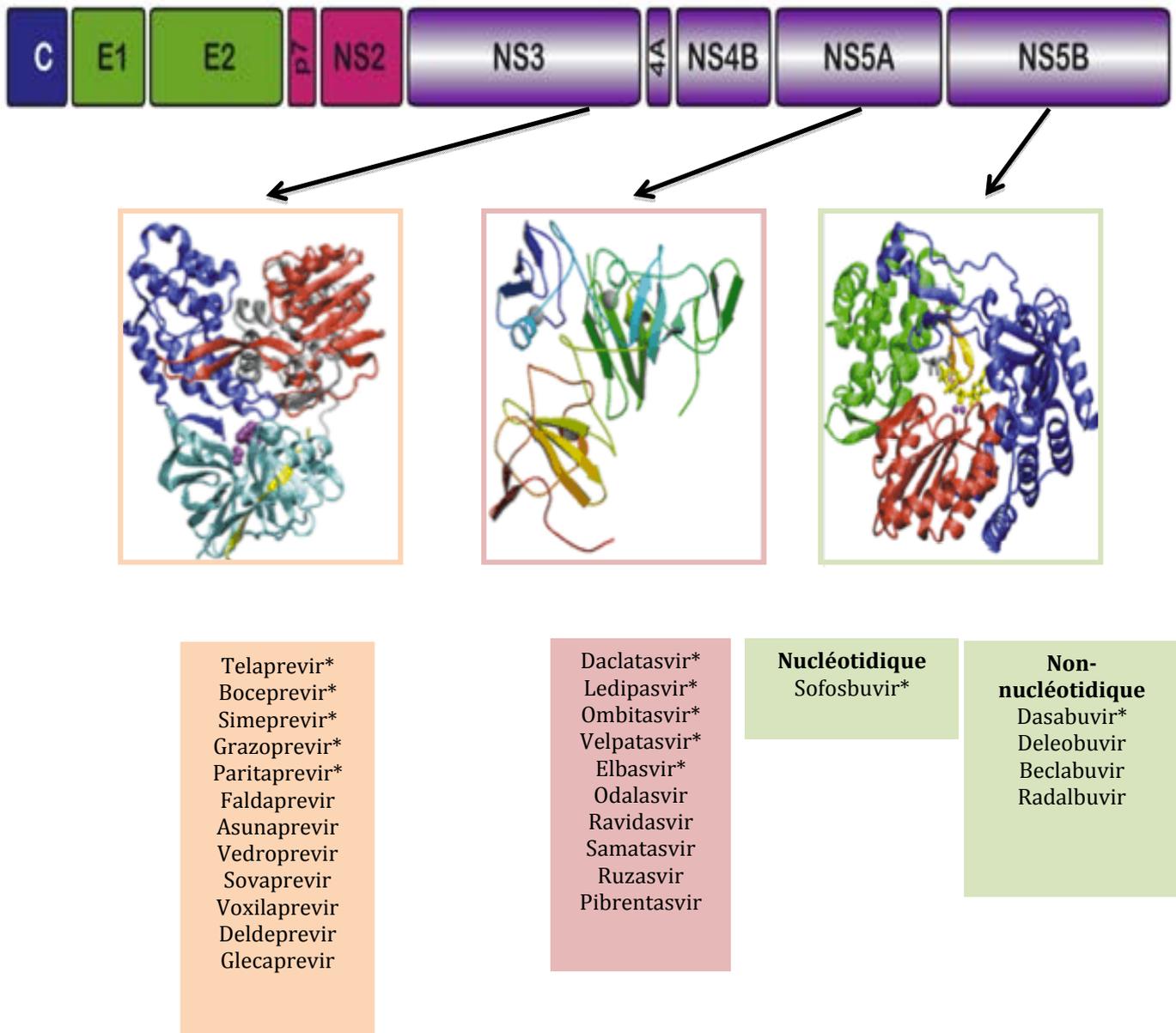


Figure 18: Inhibiteurs commercialisés agissant spécifiquement sur le VHC. La structure cristallographique des protéines NS3/4A, NS5A, et NS5B sont encadrées. *Molécules utilisées cliniquement pour traiter les patients

été testé chez les patients (Toniutto et al., 2007) mais le développement clinique de cette molécule a été arrêté en raison de sa toxicité. En revanche, le sofosbuvir combine grande efficacité, haute barrière de résistance et action pangénotypique. Cette molécule a été identifiée comme pouvant servir d'intermédiaire pour les thérapies sans IFN (Gane et al., 2013).

Le sofosbuvir (Lam et al., 2012) est la molécule centrale et indispensable des traitements actuels qui a révolutionné la prise en charge thérapeutique des patients. Cette molécule est un analogue nucléosidique commercialisé par Gilead Sciences début 2014. Le sofosbuvir est une pro-drogue utilisant le métabolisme intracellulaire du foie, la phosphorylation, pour obtenir une forme pharmacologiquement active d'un analogue triphosphate de l'uridine. Ce dernier va être incorporé au niveau de l'ARN nouvellement synthétisé et va agir comme un agent terminal. L'activité de cette molécule est pangénotypique, a une barrière de résistance élevée et des effets secondaires mineurs chez les patients, de type maux de tête et malaises (Afdhal et al., 2014 ; Abraham et al., 2014 ; Chahine et al., 2016 ; Lawitz et al., 2015b ; Kirby et al., 2015).

Les inhibiteurs non nucléosidiques de NS5B constituent une classe de molécules un peu plus hétérogène. Ces molécules inhibent l'activité de NS5B par liaison à différents sites allostériques de l'enzyme entraînant un changement de conformation après que le complexe d'élongation soit établi (Bartenschlager et al., 2013). Au niveau de NS5B, il y a 4 sites potentiels de liaison pour des inhibiteurs non nucléosidiques tels que BI 207127 (Ramirez et al., 2014), le beclabuvir (Gentile et al., 2015) et le dasabuvir (Lawitz et al., 2016). Les inhibiteurs non nucléosidiques utilisés contre NS5B ont une activité antivirale modérée, principalement contre le génotype 1, et une faible barrière de résistance. De plus ces inhibiteurs ne ciblent pas des régions conservées de NS5B (Lange and Zeuzem, 2013).

I.9.b.iii Molécules ciblant les glycoprotéines d'enveloppe

Beaucoup de petites molécules ciblant les glycoprotéines d'enveloppe du virus ont montré une activité antivirale en culture cellulaire, comme l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG : *epigallocatechin-3-gallate*) (Calland et al., 2012), la delphinidine (Calland

et al., 2015), le composé 281816 (Al Olaby et al., 2014), la tetrahydroquinoline HCV-II1 (Bush et al., 2014), la ferroquine (Vausselin et al., 2013), le composé B5 (Vausselin et al., 2016) et l'analogue nucléosidique aUY11 (Colpitts et al., 2013). Cependant, ces molécules n'ont pas été développées dans le cadre d'essais cliniques dans le traitement de l'hépatite C.

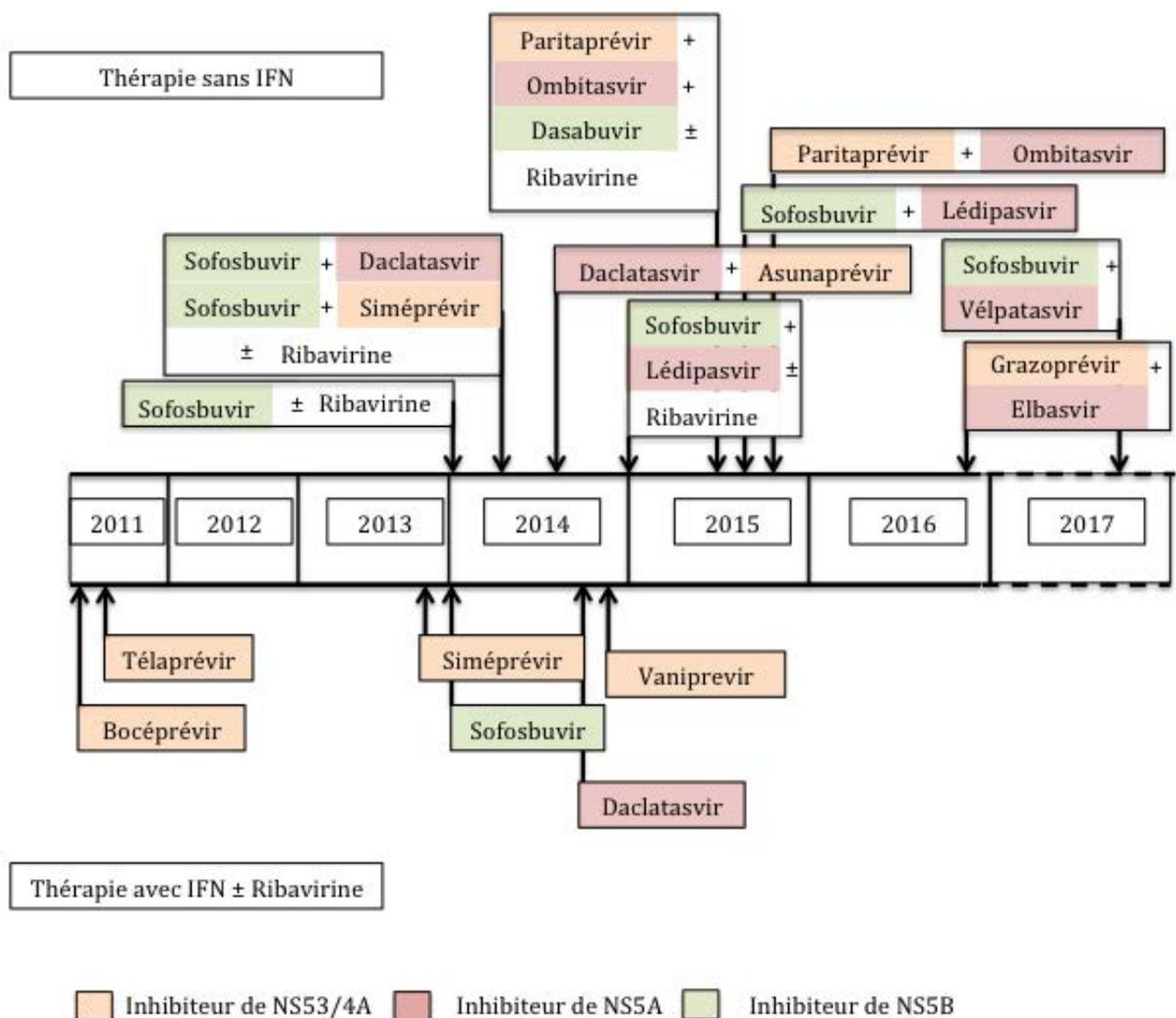


Figure 19: Traitements dirigés contre le VHC approuvés ou en cours de développement. (D'après (Tamori et al., 2016))

Figure 19: Traitements dirigés contre le VHC approuvés ou en cours de développement. (D'après (Tamori et al., 2016))

I.9.c. Agents antiviraux dirigés contre la cellule hôte

Certains facteurs de l'hôte impliqués dans l'infection du VHC peuvent être également la cible d'une stratégie antivirale. Plusieurs de ces facteurs sont des enzymes, des récepteurs ou des kinases, mais les lipides associés au virus peuvent aussi être ciblés.

La cyclophiline A (voir I.4.d.i) est une enzyme cellulaire améliorant la réplication du VHC (Kaul et al., 2009). L'alisporvir (Paeshuyse et al., 2006) est un inhibiteur de la cyclophiline disponible oralement et ayant une activité antivirale contre le VHC. Cette molécule est active contre tous les génotypes viraux et a une haute barrière de résistance (Flisiak et al., 2009). Elle est actuellement en phase III d'essai clinique contre le génotype 1b du VHC (Cuypers et al., 2016)

Le micro-ARN miR122 (voir I.4.d.i) spécifique du foie lie différents sites du VHC, notamment dans sa région 5'UTR. Ce micro-ARN a un rôle essentiel lors de la réplication (Lanford et al., 2010). Le miravirsén est un oligonucléotide antisens qui se fixe à l'ARN viral, prévenant ainsi la liaison du micro-ARN sur la région 5'UTR du VHC. L'étude

clinique en phase II a montré que cette molécule permettait de réduire de 2,7 log₁₀ UI/ml l'ARN viral présent dans le sérum des patients (Janssen et al., 2013; Lindow and Kauppinen, 2012; Sendi et al., 2015).

D'autres molécules ciblant les facteurs cellulaires de l'hôte impliqués dans l'entrée, tels que l'elortinib ciblant l'EGFR (Lupberger et al., 2011) ont été développées. L'elortinib bloque l'association CD81-CLDN1 essentielle pour l'infection. L'ezetimibe, ciblant le récepteur NPC1L1 et empêchant le transfert de cholestérol (Sainz et al., 2012), et le ITX5061, ciblant le récepteur SR-BI (Syder et al., 2011), sont en phase de développement clinique.

Beaucoup de petites molécules ciblant les glycoprotéines d'enveloppe du virus ont montré une activité antivirale en culture cellulaire, comme l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG : *epigallocatechin-3-gallate*) (Calland et al., 2012), la delphinidine (Calland et al., 2015), le composé 281816 (Al Olaby et al., 2014), la tetrahydroquinoline HCV-II1 (Bush et al., 2014), la ferroquine (Vausselin et al., 2013), le composé B5 (Vausselin et al., 2016) et l'analogue nucléosidique aUY11 (Colpitts et al., 2013).

Certains anticorps ont montré une inhibition de l'infection, comme l'anti-CD81 (Meuleman et al., 2008), l'anti-SRBI (Lacek et al., 2012), et l'anti-CLDN1 (Fofana et al., 2010). D'autres composés étudiés vont plutôt interagir avec la fluidité membranaire, comme les phenothiazines (Chamoun-Emanuelli et al., 2013), les benzhydryl-piperazines (Chamoun-Emanuelli et al., 2014) et le curcumin (Anggakusuma et al., 2014). Enfin, des composés vont perturber le trafic endosomal de la cellule, comme l'arbidol (Blaising et al., 2013a) et la silibinine (Blaising et al., 2013b).

I.9. d Traitement en fonction des génotypes viraux

Malgré le fait que certaines molécules soient actives contre plusieurs génotypes du VHC, l'administration des molécules s'effectue en combinaison afin d'avoir la SVR la plus élevée possible. L'efficacité des différents traitements administrés aux patients, en fonction du stade de leur hépatite et de la durée du traitement est répertoriée dans le tableau 2.

I.9.e Facteurs influençant l'efficacité des traitements

I.9.e.i Facteurs de l'hôte

I.9.e.i.1. Polymorphisme du gène IL28B

Plusieurs études ont montré que le polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP : « *Single Nucleotide Polymorphism* ») sur le chromosome 19 au sein du gène IL28B, codant pour l'IFN- λ 3, était lié à la clairance spontanée du virus chez les patients infectés par le VHC (Balagopal et al., 2010; Ge et al., 2009; Thomas, 2010; Rembeck et al., 2015). L'IFN- λ 3, appartient à la famille des IFN- λ , produits pour lutter contre les infections virales, bactériennes et parasitaires. Ces IFN- λ permettent d'induire l'augmentation de

Génotype	Traitement	Ribavirine	Echec d'un précédent traitement	Cirrhose	Durée (semaines)	SVR
1a ou 1b	Simeprevir	-	+/-	-	12	94%
	Sofosbuvir			+	24	97%
1a ou 1b	Ledipasvir Sofosbuvir	-	+/-	-	12	97%
		-	-	+	24	97%
		+	+	+	12	97-100%
	+	+	+	12	96%	
1a ou 1b	Daclatasvir	-	+/-	-	12	96-98%
	Sofosbuvir	+/-	+/-	+	24	1a 76% 1b 100%
1a ou 1b	Elibasvir	-	+/-	+/-	12	95%
	Grazoprevir	+	+/-	+/-	16	97-100%
1a	Paritaprevir	+	+/-	-	12	96-97%
	Ritonavir	+	-	+	24	96%
	Ombitasvir	+	+	+	24	96%

1b	Dasabuvir	-	+/-	-	12	97-
		+/-	+/-	+	12	100%
2	Sofosbuvir	+	+/-	+/-	12-16	93-94%
3		+	+	-	24	90-95%
			-	+	24	92%
		+	+/-	24	62-87%	
2	Daclatasvir	+/-	-	+/-	24	92%
3	Sofosbuvir	-	-	-	12	97%
		+	+	+	24	-
4	Paritavir Ritonavir ombitasvir	+	+/-	-	12	100%
4	Elbasvir Grazoprevir	-	-	+/-	12	97%
		+	+	+/-	16	100%
4	Ledipasvir	-	+/-	+/-	12	95%
5 et 6	Sofosbuvir	-	-	+/-	12	95/96%
1 à 6	Sofosbuvir	-	-	+ /-	12	-
	Velpatasvir	+	+	+	24	-

Tableau 2 : Administration des différents traitements en fonction du génotype des patients (d'après (Zhang et al., 2016)).

l'expression des lymphocytes T, essentiels pour une réponse immunitaire efficace. La combinaison bi-allélique CC (K70R) est favorable à une clairance spontanée du virus d'environ 82%, tandis que les combinaisons CT ou TT montrent une clairance spontanée du virus de l'ordre de 32% (Ge et al., 2009). La distribution allélique CC chez les individus varie géographiquement : on retrouve très peu cette combinaison chez les individus Africains et Européen, alors qu'elle est très courante chez les individus présents dans l'Est de l'Asie (Thomas, 2010). Ceci explique pourquoi l'efficacité des traitements contre le VHC varie en fonction des ethnies.

Lors de l'utilisation de nouveaux traitements, la détermination du polymorphisme pour le gène IL28B est essentielle afin d'évaluer leur efficacité potentielle pour chaque patient. En considérant les taux élevés de SVR obtenus avec les nouvelles thérapies utilisant les DAAs mais aussi les coûts engendrés, il pourrait être envisagé d'administrer uniquement la combinaison IFN α / ribavirine pour les individus ayant un polymorphisme favorable à une clairance spontanée du VHC, et d'utiliser pour les autres individus les thérapies plus coûteuses.

I. 9. e. i. 2 Polymorphisme du gène inosine triphosphate (IPTA) et anémies liés aux traitements par le ribavirine

L'anémie hémolytique est un effet secondaire couramment observé lors des thérapies anti-VHC basées sur la ribavirine. C'est un phénomène réversible et dose dépendant (Soriano et al., 2012). Le polymorphisme du gène IPTA protège de l'anémie provoquée par la ribavirine chez les individus Européens et Américains (Fellay et al., 2010). L'identification de ce polymorphisme chez les patients permettrait d'augmenter les doses de ribavirine pour ceux ayant le polymorphisme et donc d'augmenter les chances de clairance du virus.

I. 9. e. i. 3 Récepteurs des vitamines D

Certaines études montrent l'influence de la vitamine D sur les traitements contre le VHC. De façon très intéressante, ces études mettent en évidence la possibilité d'ajouter la vitamine D à la thérapie PEG-IFN- α 2b/ribavirine, pour les patients de génotype 1, 2 et 3, n'ayant jamais eu d'autres traitements. La vitamine D présente dans

le sang est transportée jusqu'au foie par une protéine se liant spécifiquement avec elle. Arrivée dans le foie, la vitamine D est hydroxylée en 25-hydroxy-vitamine D. Cette forme permet de réduire les niveaux intra et extracellulaires de VHC (Gal-Tanamy et al., 2011; Matsumura et al., 2012). Trois protéines (CYP2R1 ; GC et DHCR7) liant la vitamine D présentent un SNP spécifique lié à des niveaux plus faibles de 25-hydroxy-vitamine D. Ce SNP est retrouvé chez les patients ayant un hépatocarcinome (Lange et al., 2013). Comprendre le rôle de la vitamine D pourrait donc permettre de prévenir certains cancers liés au VHC.

I.9. e. ii Virus résistants aux DAAs

L'une des caractéristiques du VHC est qu'il existe une multitude de variants viraux, appelés quasi-espèces, présents chez les individus infectés. En d'autres termes, la population virale est composée d'une population majoritaire de type sauvage (wt : « *wild-type* ») et d'une population minoritaire de variants provenant de la réplication virale au sein des individus favorables au maintien de l'infection (Bartenschlager et al., 2013; Bukh et al., 1995; Duffy et al., 2008; Thompson and McHutchison, 2009). Ces variants permettent également d'expliquer les différents génotypes et sous-types de virus présents dans le monde. C'est donc contre une population virale hétérogène que les DAAs doivent être efficaces.

Des variants résistants, au sein de l'individu, sont plus ou moins rapidement sélectionnés et amplifiés lors des traitements utilisant les nouveaux DAAs décrits précédemment. Ce phénomène correspond à la barrière de résistance des molécules. Si les variants résistants sont obtenus rapidement, alors la molécule ou le traitement a une faible barrière de résistance. Les variants résistants apparaissent lors de l'utilisation des DAAs sur des durées de traitement longues et sont en général associés à des mutations spécifiques. L'apparition de ces variants résistants est un problème majeur, car elle empêche la guérison des personnes infectées.

Plusieurs méthodes de séquençage et d'identification de ces mutations peuvent être utilisées afin de les identifier, tels que les tests d'hybridation, les tests d'enzymes de

DAA	Barrière de résistance	Variants résistants						
Inhibiteurs de NS3/4A								
Telaprevir	Faible	V36A/M		R155K/T/K		A156S/D/T/V		
Boceprevir	Faible	V36A/M		R155K/T/K		A156S/D/T/V		
Simeprevir	Modéré		Q80R/K					D168A/V/T/H
Vaniprévir	Modéré			R155K/T/K		A156S/D/T/V		D168A/V/T/H
Asunaprevir	Modéré		Q80R/K	R155K/T/K				D168A/V/T/H
Paritaprevir	Modéré			R155K/T/K				D168A/V/T/H
Grazoprevir	Haute			R155K/T/K		A156S/D/T/V		D168A/V/T/H
Inhibiteurs de NS5A								
Daclatasvir	Modéré					L31F/M/V		Y93C/H/N
Ledipasvir	Modéré					L31F/M/V		Y93C/H/N
Ombitasvir	Modéré	M28T	Q30E/R					Y93C/H/N
Velpatasvir	Modéré	M28T	Q30L/R			L31M/V/P		Y93H/N
Elbasvir	Non connu	M28T	Q30L/R					Y93H/N
Inhibiteurs de NS5B								
Sofosbuvir	Haute	S282T						
Dasabuvir	Modéré	C316Y/N	S368T	M414T/I/V	Y448C/H	G554D/S	S556G	D559G

Tableau 3 : Principales mutations de résistance apparaissant après l'utilisation des différents DAAs (D'après (Tamori et al., 2016; Lontok et al., 2015)).

restriction, le séquençage direct et la technique de dernière génération de séquençage (NGS) (Sarrazin and Zeuzem, 2010)(Castelain et al., 2004).

Pour les différentes molécules utilisées contre le VHC, les profils de résistance majoritaire ont été listés dans le tableau 3, de même que le degré de résistance observé. Enormément de mutations minoritaires sont également observées chez les patients. Ces mutations de résistance sont responsables de la majorité des échecs thérapeutiques chez les patients à 12 et 24 semaines. Dans ces cas là, une stratégie thérapeutique différente devra être envisagée.

I.9. f Mise au point d'un vaccin

Le meilleur moyen de lutter efficacement contre le VHC serait la mise en place d'une stratégie vaccinale. Deux types de vaccins peuvent être envisagés, les vaccins prophylactiques ou thérapeutiques, mais à ce jour aucun de ces deux types de vaccin n'est disponible. La difficulté dans le développement d'un vaccin contre le VHC est principalement liée au grand nombre de génotypes et sous-type existants, ainsi que la présence de quasi-espèces virales liées à un grand nombre de mutations.

Les vaccins prophylactiques ont pour objectif de développer chez les patients une réponse immunitaire humorale efficace et de prévenir le stade chronique de la maladie. Il est évident que le rôle des lymphocytes T CD8+ et T CD4+ est essentiel pour le contrôle de l'infection primaire et secondaire du VHC (Thimme et al., 2002; Urbani et al., 2006; Folgori et al., 2006). L'immunité naturelle basée sur la réponse des lymphocytes T CD4+ et CD8+ est étudiée afin d'être spécifiquement stimulée, tout comme l'induction d'anticorps neutralisants pouvant renforcer l'efficacité de la réponse immunitaire.

La stratégie prophylactique vise essentiellement les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. Cette stratégie est basée sur l'observation de protéines recombinantes E1E2 induisant la production importante d'anticorps chez les chimpanzés, permettant ainsi de les protéger partiellement de l'infection par le VHC (Choo et al., 1994; Meunier et al., 2011). Un essai de phase clinique I a été réalisé sur 60 volontaires. Après immunisation avec différentes doses de protéines recombinantes E1E2 (Frey et al., 2010), une induction intéressante des lymphocytes T CD4+ et CD8+ a été observée. La capacité de

neutralisation des anticorps induite par le vaccin a été testée sur les VHCpp. Une neutralisation est détectée pour un certain nombre de patients mais pas pour la totalité, démontrant une neutralisation hétérogène pour les patients infectés avec les géotypes 1a, 1b et 2a du VHC (Stamataki et al., 2011). La protéine core additionnée à un adjuvant, ISCOMATRIX, connu pour induire une augmentation des lymphocytes T CD4+ et CD8+, a été testée en essai clinique de phase I sur 30 volontaires (Drane et al., 2009). Une réponse humorale spécifique chez 23/24 volontaires a été observée, alors que la réponse lymphocytes T CD8+ n'a été observée que chez 2/8 volontaires ayant reçu de fortes doses (Drane et al., 2009).

L'utilisation de protéine recombinante dans cette approche vaccinale prophylactique présente quelques inconvénients comme le repliement incorrect des protéines et le processus de production. Afin de pallier à ces problèmes, Elmowalid et ses collaborateurs ont développé des particules VLPs (VLPs : « *virus-like particles* ») exprimant les protéines structurales du VHC comme un potentiel vaccin candidat (Elmowalid et al., 2007). A l'issue de l'étude, la totalité des chimpanzés traités étaient immunisés avec ces particules et développaient une réponse lymphocyte T CD4+ et CD8+ spécifique. Sur les quatre chimpanzés traités, pendant 10 semaines, trois d'entre eux avaient éliminé le virus. Aucun essai clinique chez l'homme n'a été mis en place avec cette approche. D'autres concepts ont été développés utilisant des VLPS recombinantes avec le VHB (Beaumont et al., 2013), recombinantes avec des VHCcc (Akazawa et al., 2013) ou avec des particules rétrovirales exprimant les glycoprotéines d'enveloppe du VHC (Garrone et al., 2011).

Les vaccins thérapeutiques reposent essentiellement sur l'expression d'un ou plusieurs antigènes viraux (Ip et al., 2012). Une des difficultés est d'induire une réponse immunitaire élevée chez les individus porteurs chroniques du VHC, comparable à celle obtenue chez les individus sains au cours des essais cliniques (Barnes et al., 2012). En effet, lors de différents essais aucune baisse significative de la virémie VHC n'a été observée après administration de ces vaccins thérapeutiques chez les patients chroniquement infectés. Ceci est dû au fait que les lymphocytes T circulants, induits par le vaccin, ne ciblent pas le virus.

Deux concepts ont été étudiés en détails lors des essais cliniques de ces vaccins thérapeutiques. Le premier concept est un peptide vaccin, IC41, contenant 4 peptides synthétiques, provenant des protéines core, NS3 et NS4 et correspondant aux régions conservées, pouvant interagir avec les lymphocytes T CD8+ et CD4+. Les essais cliniques de phase I et de phase II ont démontré que les patients tolèrent bien ce vaccin, mais que la réponse lymphocyte T est faible (Firbas et al., 2006; Klade et al., 2008; Schlaphoff et al., 2007). Aucun changement n'est observé sur la charge virale des patients chroniquement infectés (Klade et al., 2008). Le deuxième concept intéressant pour le développement d'un vaccin thérapeutique, est le poxvirus recombinant TG4040. Ce poxvirus exprime certaines protéines du VHC, NS3, NS4A et NS5B, contenant des épitopes immunodominants (Habersetzer et al., 2011). L'étude chez des patients ayant une hépatite chronique légère montre que le vaccin induit une faible réponse immunitaire et n'a pas d'effet sur la charge virale (Habersetzer et al., 2011). Plusieurs autres vaccins candidats contre les glycoprotéines d'enveloppe du VHC, contre la protéine E1 (Leroux-Roels et al., 2004), l'ADN codant pour core-E1-E2 (Alvarez-Lajonchere et al., 2009) et contre le complexe protéique E1 et E2 (Colombatto et al., 2014) chez les individus chroniquement infectés (essais clinique de phase 1 et 1b) ont été testés.

En conclusion, la corrélation entre les anticorps de l'hôte produits en réponse au VHC et la clairance virale suggèrent que la présence d'anticorps neutralisants contre des épitopes conservés est essentielle afin d'élaborer un vaccin efficace.

II/ Composés naturels inhibant le VHC

Les molécules récemment mises sur le marché pour lutter contre le VHC, notamment le sofosbuvir, sont très onéreuses et ne sont pas accessibles financièrement dans tous les pays. Le 25 Mai 2016, la Ministre de la Santé Marisol Touraine a déclaré un accès universel aux nouveaux traitements contre le VHC pour les patients français. Toutefois dans les faits, ces traitements, en raison de leurs coûts, ne sont pas disponibles en quantité suffisante pour traiter tous les patients. Dans ces conditions certains patients restent prioritaires par rapport à d'autres, tels que les patients atteints de fibrose, transplantés ou en attentes de greffe ainsi que les populations les plus vulnérables. Par ailleurs, l'apparition de résistance dans le génome viral rend ces traitements inefficaces pour 5 à 10% des patients.

Depuis des siècles, les plantes sont utilisées en médecine traditionnelle pour soigner différentes maladies. Les pays présents sur les continents Asiatique, Africain et ceux présents en Amérique latine ont recours encore aujourd'hui à des tradipraticiens utilisant la médecine traditionnelle pour prévenir, diagnostiquer ou soigner certaines maladies (Chin et al., 2006). D'après l'OMS, en Afrique, actuellement 80% de la population a recours à la médecine traditionnelle. Dans les pays industrialisés le terme de « médecine complémentaire ou parallèle » est davantage utilisé à la place de « médecine traditionnelle ». Par exemple au Royaume-Uni, environ 28 millions d'euros par an sont dépensés dans la médecine parallèle. Aux Etats-Unis également, les ménages ont consacré 13 milliards d'euros à l'utilisation de produits naturels en médecine traditionnelle et complémentaire en 2008 (WHO 2014).

Dans certains pays émergents ou en voie de développement, le seul traitement disponible actuellement pour lutter contre l'hépatite C est la combinaison PEG-IFN- α et ribavirine. C'est le cas au Cameroun, où les habitants ont recours de manière intense, par tradition, à la médecine traditionnelle (Marzio et al., 2014). Les plantes utilisées depuis plusieurs siècles pour lutter contre des problèmes de santé liés au foie sont donc une source potentiellement intéressante de molécules naturelles bioactives. Le processus d'extraction et de production des molécules dites « naturelles » est plus simple et entraîne un coût plus faible que la production des molécules dites « synthétiques »

issues de synthèse chimique. Ces molécules naturelles utilisées en complément des traitements actuels peuvent alors être une alternative intéressante afin de diminuer le coût des traitements et de les rendre plus accessibles.

Les extraits bruts de plantes plus spécifiquement d'écorces, feuilles, tiges, racines et de fruits utilisées en médecine traditionnelle sont une source très importante de composés bioactifs (Ferrucci et al., 2010). C'est le cas de l'artémisinine qui a valu le prix Nobel de médecine à Youyou Tu en 2015. L'extrait brut de plante chinoise *Artemisia annua* est utilisé depuis 2000 ans dans ce pays contre le paludisme. L'artémisinine, extraite directement à partir de la plante par le laboratoire Sanofi, est utilisée dans des médicaments antipaludisme depuis une dizaine d'années. Cependant, depuis juin 2016 tous les médicaments antipaludisme qui utilisent en monothérapie la molécule artémisinine ont été retirés du marché car ils étaient responsables du développement de résistance contre les traitements (OMS juin 2016).

De nombreux extraits de plantes utilisées en médecine traditionnelle ont été testés contre le VHC. Certains de ces composés ont été répertoriés dans une revue « Natural compounds and Hepatitis C » qui sera publiée prochainement (Séron et al., 2017). Un exemple est celui de la plante *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) utilisée en médecine traditionnelle camerounaise et dont une activité intéressante contre le VHC a été démontrée (Galani et al., 2016). Afin d'isoler et d'identifier les molécules actives de cet extrait, un fractionnement bio-guidé a été effectué. Ce fractionnement consiste à isoler, par l'utilisation de solvant de polarités différentes, l'ensemble des molécules actives d'un extrait brut. Il a ainsi pu être mis en évidence 3 composés actifs contre le VHC.

Les molécules antivirales actives contre le VHC et issues d'extraits de plantes peuvent être classées en différents groupes selon leur structure chimique : les composés phénoliques, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les porphyrines. Tous ces composés sont des métabolites secondaires chez les plantes. Quelques exemples de molécules issues de chacune de ces classes ayant une activité intéressante sur le VHC sont décrits dans la Figure 20.

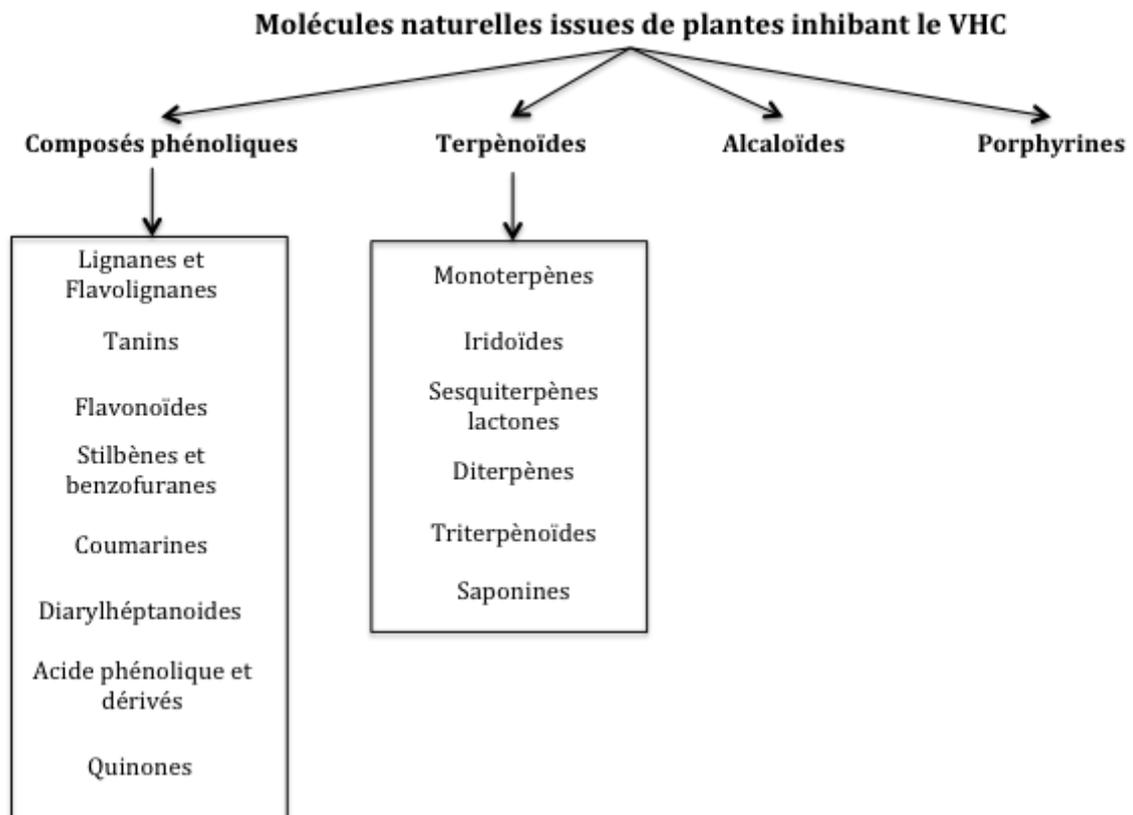


Figure 20: Classes de composés naturels issues de plantes inhibant le VHC (D'après (Séron et al., 2017))

II.1 Les composés phénoliques

Les excellentes propriétés antioxydantes des composés phénoliques ont fait d'eux un sujet de recherche très populaire ces dernières décennies, aussi bien pour leurs effets contre les cancers, dans traitement de l'hypertension, sur le microbiote, sur l'obésité... Les molécules issues de la classe des composés phénoliques ont également des effets antiviraux contre de nombreux virus notamment le VHB, (Wu, 2016), le virus de l'influenza (Bahramsoltani et al., 2016), le VIH (Andrae-Marobela et al., 2013) et aussi le VHC. L'activité de certains de ces composés contre le VHC est présentée ci-dessous.

II.1.a Lignanes et flavolignanes

Les lignanes et les flavolignanes sont des composés importants participants à la formation de la paroi cellulaire des végétaux.

La silymarine est un composé phénolique, appartenant à la classe des lignanes, issue des Chardons-Marie (*Silybum marianum*, Asteraceae) (Ulschmid et al., 1952). Les molécules constituant la silymarine sont la silibiline, la silychristine et la silydianine (Figure 21) (Kroll et al., 2007; Althagafy et al., 2013).

La silymarine est connue comme ayant une activité hépatoprotectrice lors d'hépatites virales B et C, (Polyak et al., 2013; Wei et al., 2013; Adeyemo et al., 2013), notamment lors dans les cas de fibroses du foie (Clichici et al., 2016; Fried et al 2012) et de stéatoses alcooliques (Ni and Wang, 2016). Cette molécule inhibe l'infection du VHC durant l'étape d'entrée, notamment lors de l'endocytose et de la fusion (Ashfaq et al., 2011 ; Blasing 2013). De façon très intéressante, la silymarine inhibe aussi la production des virions et a un effet inhibiteur lors de la transmission cellule-cellule du VHC (Wagoner 2010). La silibiline, quant à elle, inhibe l'action de la RdRp NS5B en système réplicon (Wagoner 2011 ; Beinhart et al., 2011 ; Ferencic et al., 2008 et 2013). Cette molécule a aussi une action sur NS4B, mais des mutations de résistance sont rapidement apparues lors de son utilisation sur le VHCcc en culture cellulaire (Esser-Nobis et al., 2013). L'efficacité de la silymarine *in vitro* varie en fonction des génotypes du VHC. Cette molécule a déjà été testée lors d'essais cliniques (Hawke et al., 2010). Aucune activité anti-VHC n'a été montrée pour la silychristine et la silydianine.

L'honokiol provenant de l'écorce de *Magnolia officinalis*, plante utilisée en médecine traditionnelle asiatique, inhibe l'entrée et la réplication du VHC (Lan 2012).

D'autres lignanes, le tétrahydrofurane et le secolignane, provenant d'une plante brésilienne, *Maytenus ilicifolia*, inhibent quant à eux uniquement la réplication du VHC et agissent contre le mutant résistant au daclatasvir NS5A-Y93H (Jardim et al., 2015).

II.1.b Les tanins

Les tanins sont des métabolites secondaires des plantes responsables des différences au toucher et des différences de goût qu'il y a entre elles. Ces molécules sont retrouvées dans l'ensemble du règne végétal. Parmi cette classe de molécule, l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) et la delphinidine ont été particulièrement étudiées au cours de ce travail et seront décrits dans le paragraphe II.5.

II.1.c Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très présentes dans le règne végétal. Ces molécules représentent la sous-classe des composés polyphénoliques la plus vaste. A ce jour, plus de 6500 métabolites secondaires issus des flavonoïdes ont été caractérisés dans différentes plantes (Harborne and Williams, 2000; Ververidis et al., 2007) représentant ainsi 50% des composés phénoliques (Lobstein et al., 2001).

Les paramètres nécessaires sont manquants ou erronés.

Figure 21: Structure chimique des trois molécules présentes dans la silymarine (d'après Kroll 2007) : la silibiline, la silychristine, la silydianine

Les paramètres nécessaires sont manquants ou erronés.

Figure 22: Structure chimique de la quercétine

Les paramètres nécessaires sont manquants ou erronés.

Figure 23: Structure chimique de la naringénine

La quercétine est un flavanol appartenant à la famille des flavonoïdes (Figure 22). Ce flavanol est retrouvé dans différents aliments tels que les oignons rouges, les brocolis, et les pommes. Cette molécule a des propriétés inhibitrices du VHC : la quercétine empêche le recrutement de la protéine cellulaire HSP70 au site IRES de l'ARN viral, ce qui est indispensable pour l'initiation de la traduction (Gonzalez et al., 2009). Un essai clinique de phase I réalisé avec des patients infectés par le VHC a montré qu'avec des doses élevées de quercétine, la charge virale des patients diminuait (Lu et al., 2016). La quercétine est l'un des composés actifs présent dans l'extrait brut de la plante indonésienne *Kalanchoe pinnata* inhibant l'entrée du VHC (Kardonob et al., 2014). Ce composé extrait cette fois-ci de l'embelie (*Embelia ribes*) inhibe aussi la protéase virale NS3 (Bachmetov et al., 2012). L'activité de cette molécule extraite d'une autre plante de la même famille, *Embelia schimeri*, a aussi été montrée. Un autre composé dérivé de la quercétine, le quercetin-3-methyl, a été extrait de l'arbre à gentiane (*Solanum rantonnetii*, Solanaceae) et est également très actif contre le VHC (Rashed et al., 2014). La quercétine isolée et purifiée à partir de différentes plantes est un inhibiteur potentiellement intéressant pour les thérapies anti-VHC à faible coût. Cette molécule a également des effets antiviraux contre le virus de la dengue, un coronavirus murin (MHV, murine hepatitis virus) et les rhinovirus (Chiu et al., 2016 ; Ganesan et al., 2012).

La naringénine (Figure 23) est un composé appartenant également à la famille des flavonoïdes et présent dans les pamplemousses (*Citrus x paradisi*, Rutaceae). Cette molécule permet de diminuer les titres infectieux du VHC, la sécrétion de la protéine core, et les niveaux d'ARN et d'apoB associés au virus (Nahmias et al., 2008). La naringénine est également active sur l'assemblage des virions dans les hépatocytes primaires humains (Khachatoorian et al., 2012; Goldwasser et al., 2011).

II.1.d Les diarylhéptanoïdes

Les diarylhéptanoïdes sont retrouvés principalement dans les dérivés de curcuma. Ces molécules ont des propriétés anticancéreuses.

La curcumine (Figure 24) appartient à la classe des diarylhéptanoïdes et est présente dans les rhizomes de l'épice curcuma appartenant à la famille du gingembre (*Curcuma longa*, Zingiberaceae). Cette molécule est responsable de la couleur jaune du *Curcuma*. La curcumine inhibe de manière pangénotypique l'entrée du virus (Anggakusuma et al., 2014). Ce composé agit directement sur le virus, inhibant l'étape de liaison et de fusion lors de l'entrée virale, mais altérant aussi la fluidité de l'enveloppe virale. La curcumine est aussi active sur l'entrée des VHCcc dans les hépatocytes primaires humains (Aras et al., 2014) et inhibe la transmission cellule-cellule des virions et la réplication du VHC (Chen et al., 2012).

II.2 Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures, principalement présents dans les végétaux et conférant généralement une odeur particulière à ces derniers. Ces molécules ont également des vertus thérapeutiques, comme le limonène, qui donne un parfum différent entre les agrumes mais protège aussi l'organisme des brûlures d'estomac.

II.2.a Saponines

Les saponines sont des métabolites secondaires des plantes mais leurs rôles précis ne sont pas encore bien compris.

La glycyrrhizine (Figure 25), le principe actif de la réglisse, a de multiples effets contre le VHC. Ce composé a été utilisé pour le traitement de l'hépatite chronique au Japon, car il permettait de réduire les taux de transaminases dans le sang (Ashfaq et al., 2011; Matsumoto et al., 2013).

D'autres composés comme la saikosaponine (Lin et al., 2015) et la lamirodosine (Zhang et al., 2009a) sont des terpènes ayant une activité anti-VHC.

Les paramètres nécessaires sont manquants ou erronés.

Figure 24: Structure chimique du curcumine

Les paramètres nécessaires sont manquants ou erronés.

Figure 25: Structure chimique de la glycyrrhizine

Les paramètres nécessaires sont manquants ou erronés.

Figure 26: Structure chimique des 4 catéchines les plus abondantes dans le thé vert.

II.3 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de molécules qui se présentent sous forme d'hétérocycles azotés telles que la nicotine, la morphine et la caféine. Parmi les alcaloïdes, la myribérine A (Huang et al., 2013), le quinolizine (Cao et al 2014), le pseudane IX et le chalepine (Wahyuni et al., 2014) inhibent la réplication du VHC.

II.4 Les porphyrines

Dans le règne végétal, les porphyrines sont responsables de la formation de la chlorophylle, indispensable au déroulement de la photosynthèse. Deux molécules de type porphyrines issues de la plante *Morinda citrifolia* (Ratnogliik et al., 2014) ont des effets sur les étapes d'entrée et post-entrée du VHC.

II.5- Exemples de l'EGCG et de la delphinidine comme inhibiteurs du VHC

II.5.a. L'EGCG

Quatre variétés de thé sont connues : le thé blanc, le thé vert, le thé oolong et le thé noir. Le thé vert correspond seulement à 20% de la production totale de thé (Thakur et al., 2012) dans le monde. Le thé vert est cependant l'une des boissons les plus consommées dans le monde (Graham, 1992). Il est obtenu à partir de la fermentation de feuilles de *Camellia sinensis*. Cette plante originaire de Chine est cultivée dans plus de 30 pays différents. En Chine, il est estimé que 120 ml de thé sont consommés par personne chaque jour (McKay and Blumberg, 2002). Des données obtenues par chromatographie montrent que les feuilles de thé vert sont composées de 26% de fibres, 15% de protéines, 2 à 7% de lipides, 5% de vitamines et de minéraux, 1 à 2 % de pigment, et de 30 à 40% de polyphénols dont 80% de flavonoïdes. Cette composition peut varier en fonction des conditions de croissance du thé, de sa localisation géographique, des pratiques agricoles et de la plante elle-même (variété, âge et orientation des feuilles...)

(Cabrera et al., 2006). Les tanins majoritaires présents dans le thé vert sont l'épicatéchine, l'épigallocatechine, l'épicatéchine-3-gallate et l'EGCG (Figure 26). L'EGCG est considéré comme le tanin le plus abondant et le plus actif présent dans le thé vert. Il représente environ 59% des tanins totaux.

Les infusions de thé correspondent à une extraction aqueuse chaude contenant davantage de composés hydrosolubles que liposolubles. Une augmentation du temps et de la température d'infusion des feuilles de thé enrichit le breuvage en composants hydrosolubles. L'extraction optimale des composés hydrosolubles est obtenue dans une eau à 80°C durant 5 à 15 min (Komes et al., 2011). L'EGCG reste stable et est soluble dans de l'eau chauffée à très haute température (Wang et al., 2008).

Le premier document montrant l'effet bénéfique du thé vert sur la santé humaine a été publié en 1906 par Naught. Ce médecin de l'armée a montré que le thé pouvait tuer les organismes responsables de la fièvre typhoïdique (Marchese et al., 2014). Puis l'effet bénéfique du thé a été étudié pour la seconde fois en 1980, lors des premiers tests antimicrobiens et antiviraux. Aujourd'hui, lorsque l'on cherche dans Pubmed « green tea/EGCG », environ 4000 articles sont répertoriés, montrant l'intérêt grandissant pour cette molécule. Les effets bénéfiques du thé vert ou de l'EGCG sur la santé humaine sont nombreux et incluent des effets anti-inflammatoires, anticarcinogènes, antimicrobiens, antiviraux et antioxydants (Tran et al., 2010; Reygaert, 2014; Cabrera et al., 2006; Chowdhury et al., 2016).

II.5.a.i Propriétés pharmacocinétiques chez l'homme

Les propriétés pharmacocinétiques de l'EGCG ont été étudiées chez les rongeurs (Lee et al., 2002). Quelques études ont permis également d'évaluer la biodisponibilité de l'EGCG chez l'homme, montrant une très faible absorption de l'EGCG (inférieure à 5%) avec une absorption maximale après 2h dans le tractus intestinal après une administration *per os* (Miller et al., 2012; Williamson et al., 2011; Manach et al., 2005). Les catéchines présentes dans le thé vert sont principalement absorbées dans l'intestin, dans le jejunum et l'ileum, via une diffusion paracellulaire au niveau des cellules épithéliales (Moore et al., 2009). Après absorption, l'EGCG est retrouvé à 75% dans le

plasma sous forme libre (Ullmann et al., 2003). Le volume de distribution de l'EGCG chez le rat est de 0,15L/kg, mettant en avant une distribution faible (Chen et al., 1997). Malgré cette distribution, l'EGCG est bien retrouvé dans différents tissus. En effet, cette molécule a été retrouvée dans le fœtus et le placenta de rates gestantes (Chu et al., 2006) mais aussi dans le cerveau, ayant donc passé la barrière hémato-encéphalique (Lin et al., 2007)(Scholey et al., 2012). Le temps de demi-vie de l'EGCG est de 3h lorsque cette molécule est associée à d'autres catéchines sous forme purifiée ou dans les infusions de thé (Williamson et al., 2011 ; Manach et al., 2005 ; Radhakrishnan et al., 2016). Des complexes peuvent être utilisés afin d'augmenter la durée de vie et la biodisponibilité de l'EGCG (Chung et al., 2014 ; Chow et al., 2003). L'EGCG peut être métabolisée par le microbiote intestinal (Schantz et al., 2010; van't Slot and Humpf, 2009) par méthylation (Meng et al., 2002) et peut être conjugué par sulfatation et glucuronidation (Williamson et al., 2011). Les molécules d'EGCG peuvent être réabsorbées au niveau de l'intestin par la circulation entérohépatique et sont retrouvées dans les urines uniquement sous forme de traces après une administration orale (Lee et al., 1995).

L'EGCG est en phase I d'essai clinique chez des patientes souffrant de cancer du sein et faisant de la radiothérapie. Les doses d'EGCG administrées 3 fois par jours varient entre 40 et 660 μ M. Pour une patiente de l'essai clinique, la dose 660 μ M s'est avérée être la dose limite de toxicité, des rougeurs étant apparues sur la peau. Les doses d'EGCG administrées 3 fois par jour qui sont tolérables par les patients varient donc entre 40 et 600 μ M (Zhao et al., 2016).

II. 5.b.ii Propriétés anti-carcinogène

L'EGCG a des propriétés anti-carcinogènes intéressantes (Brown et al., 1999 ; Chen et al., 2011 ; Clere et al., 2011). Le développement d'un cancer est un processus multi-étapes dans lequel des facteurs génétiques et épigénétiques sont impliqués (Hanahan and Weinberg, 2011). Les métalloprotéases matricielles sont nécessaires à la modification de la matrice extracellulaire et leurs surexpressions sont impliquées dans le développement de cancers. Il a été montré que l'EGCG pouvait bloquer la migration et l'invasion des métalloprotéases matricielles (Maeda-Yamamoto et al., 2003). L'EGCG peut également inhiber la prolifération cellulaire et induire l'apoptose cellulaire. La prolifération cellulaire est inhibée au niveau de la phase G1 (Singh et al., 2011), tandis

que l'apoptose est induite par l'inhibition du facteur anti-apoptotique NF- κ B, mais également par la diminution de Bcl-2 déclenchant une cascade de caspases (Chen and Zhang, 2007; Li et al., 2016; Zhou et al., 2016). L'induction de l'apoptose par l'EGCG est observée dans le cancer du pancréas (Liu et al., 2016) et dans le cancer du poumon (Ma et al., 2014). Une étude clinique réalisée sur 60 volontaires a également montré que l'EGCG prévenait le développement du cancer de la prostate (Bettuzzi, 2006). L'effet chimioprotecteur de l'EGCG est principalement lié à sa propriété antioxydante. En effet, l'EGCG peut piéger les radicaux libres et augmenter l'activité d'enzymes antioxydantes (Du et al., 2012).

II. 5.b.iii Propriétés antibactériennes

Chaque année en France, environ 12500 personnes décèdent à la suite d'infections par des bactéries résistantes aux antibiotiques (Antibiotics resistance 2013). Les propriétés antibactériennes du thé vert peuvent alors être intéressantes. L'EGCG se lie à la bicouche lipidique des bactéries, entraînant des dommages de la paroi bactérienne. Ces lésions de la paroi empêchent les bactéries de se fixer correctement aux membranes cellulaires hôtes. Ce phénomène permet de réduire de manière significative la pathogénicité de certaines bactéries. L'EGCG inhibe également les facteurs de virulence de *Clostridium difficile* (Yun et al., 2015), *Staphylococcus aureus* (Steinmann et al., 2013) mais aussi de *Helicobacter pylori* (Mabe et al 1999), et pourrait donc être utilisé en complément pour soigner les maladies associées à ces bactéries. Cette molécule lie également certaines protéines et macromolécules bactériennes en formant des liaisons hydrophobes, inhibant ainsi de manière importante l'activité de certaines enzymes telles que la tyrosine phosphatase et la cystéine protéinase. Ceci permet la régulation de certains métabolites toxiques produits par les bactéries (Reygaert, 2014). L'EGCG est aussi efficace contre certaines souches bactériennes résistantes aux antibiotiques lors de traitements d'infections de la peau (Jeon et al., 2014; Cui et al., 2012).

II. 5.b.iv Propriétés neuroprotectrices

Les maladies neurodégénératives englobent les symptômes allant de la diminution progressive du nombre de cellules neuronales jusqu'au dysfonctionnement du système nerveux (Brown et al., 2005). La maladie d'Alzheimer est une maladie dégénérative affectant le système nerveux central. Cette maladie est caractérisée par la production et l'accumulation de peptide β -amyloïde dans le cerveau, générant la protéolyse du précurseur de cette protéine, la protéine Tau (O'Brien and Wong, 2011). Une étude a pu montrer l'effet bénéfique de l'EGCG sur le comportement de souris atteintes de la maladie d'Alzheimer. L'EGCG semble protéger les souris contre la perte de mémoire et le dysfonctionnement du système de coordination (Walker et al., 2015; Rasoolijazi et al., 2007).

II. 5.b.v Propriétés antivirales

L'EGCG inhibe l'infection du virus de l'influenza par une altération de son enveloppe virale (Kim et al., 2013), mais peu également inhibait l'infection du virus de l'herpès par une agglutination de ses protéines d'enveloppe (Isaacs et al., 2008). Les effets antiviraux sur d'autres virus comme par exemple le VHB, le VIH, ou encore le BVDV sont décrits dans le tableau 4.

II. 5.b.v.1 Activité anti-VHC

Plusieurs équipes ont montré que l'EGCG inhibait l'étape d'entrée du VHC (Calland et al., 2012, 2015; Ciesek et al., 2011). En 2011, Cizek et ses collaborateurs ont montré que l'EGCG inhibait l'entrée du VHCcc lors de l'étape d'attachement à la surface cellulaire. Cette molécule inhibe l'infection des VHCcc aussi bien que des VHCpp. Elle affecte l'infection du virus dans les lignées classiquement utilisées en culture cellulaire telles que les Huh7 mais aussi dans les hépatocytes primaires humains. L'EGCG prévient également la propagation du virus selon le mode de transmission cellule-cellule et n'a pas d'effet sur la densité des particules virales sécrétées. L'EGCG n'agit pas sur les étapes de réplication, d'assemblage et de sécrétion des particules virales (Ciesek et al., 2011)

Virus	Effet de l'EGCG	Références
Virus de l'influenza A/B	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de l'infection des souches A et B par agglutination des particules virales • Inhibition de la réplication virale, de l'activité neuraminidase et de l'héماغlutination • Altération de l'enveloppe virale → inhibition du processus de fusion entre les particules virales et la membrane cellulaire • Inhibition de l'attachement du virus à l'acide sialique présent à la surface cellulaire 	<p>Nakayama et al., 1993; Xiao et al., 2008</p> <p>Yang et al., 2014</p> <p>Song et al., 2005</p> <p>Kim et al., 2013; Colpitts and Schang, 2014</p>
VIH	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la réplication du virus par inhibition de la rétrotranscription du virus • Destruction des particules virales, inhibition de l'attachement des particules à la surface cellulaire, inhibition post-entrée, inhibition de la production des particules virales dans des cellules chroniquement infectées, diminution de la production d'ARNm • Inhibition de l'interaction gp120/CD4 nécessaire à la liaison du virus à la surface cellulaire • Diminution de la capture du virus dans le sperme humain • Inhibition de la protéase enzymatique intégrase • Effet préventif 	<p>Harada et al., 1999 ; Haneda et al., 2000</p> <p>Fassina et al., 2002</p> <p>Li et al., 2011</p> <p>Yamaguchi et al., 2002</p> <p>Hamza and Zhan, 2006; Williamson et al., 2006; Kawai et al., 2003; Nance et al., 2009</p> <p>Hauber et al., 2009; Hartjen et al., 2012</p> <p>Popovych et al., 2012</p> <p>Tan et al., 2014</p> <p>Jiang et al., 2010; Muller et al., 2014</p>
VHB	<ul style="list-style-type: none"> • Effet hépatoprotecteur, et réduction de la propagation du virus • Inhibition de la réplication virale • Inhibition de l'entrée du virus 	<p>He et al., 2011</p> <p>Pang et al., 2014; Zhong et al., 2015; Xu et al., 2016</p> <p>Huang et al., 2014</p>
Virus Epstein-Bar	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition des protéines lytiques du virus 	<p>Chang et al., 2003a; Liu et al., 2013</p>
Adénovirus	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de l'étape d'assemblage du virus, de l'étape de clivage par l'adénaine 	<p>Weber et al., 2003</p>

VHC	<ul style="list-style-type: none"> • Cible de la protéine NS3 • Inhibition de l'étape d'entrée • Inhibition de la propagation cellule-cellule • Inhibition de l'étape de réplication • Réduction du développement de tumeurs chez les patients cirrhotiques • Inhibition de l'étape d'attachement aux héparanes sulfates • Amélioration de l'immunité humorale innée contre le virus 	Zuo et al., 2007 ; Ciesek et al., 2011 ; Calland et al., 2012, 2015 ; Fukazawa et al., 2012 Bhat et al., 2014 Roh and Jo, 2011 Chen et al., 2012 Halegoua-De Marzio et al., 2012 Colpitts and Schang, 2014 Wang et al., 2016
Virus de l'herpes simplex	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de l'infection • Liaison aux glycoprotéines d'enveloppe du virus • Agrégation des glycoprotéines d'enveloppe du virus • Ralentissement du développement des symptômes • Inhibition de l'étape d'attachement aux héparanes sulfates 	Lyu et al., 2005 Isaacs et al., 2008, 2011 Zhao et al., 2012 Colpitts and Schang, 2014
BVDV	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de l'infection 	Zhang et al., 2009b, 2010
Papillomavirus humain	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de l'oncoprotéine HPV 16 responsable de l'angiogénèse 	He et al., 2013
Virus responsable du syndrome dysgénésique chez le porc	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de l'infection virale 	Zhao et al., 2014
Virus Ebola	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de l'infection virale ayant pour cible la protéine HSPA5 	Reid et al., 2014
Virus Chikungunya	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de l'entrée du virus dans les cellules cibles 	Weber et al., 2015
Virus Zika	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de l'entrée du virus dans les cellules cibles 	Carneiro et al., 2016

Tableau 4 : Action de l'EGCG sur différents virus

De manière simultanée, Calland et ses collaborateurs ont également publié un article caractérisant l'effet de l'EGCG sur le VHC. L'équipe du laboratoire de Virologie Moléculaire et Cellulaire du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille a montré que l'EGCG inhibe l'infection du virus mais, contrairement à Cizek et ses collaborateurs, ils ont également montré que l'épigallocatechine et l'épicatéchine gallate inhibent l'infection du virus respectivement de 40 et 80%. Calland et ses collaborateurs ont aussi montré que l'EGCG inhibe l'étape d'entrée avec une IC₉₀ de 50 µM. L'inhibition de l'infection par l'EGCG n'est pas observée sur les autres membres de la famille des *Flaviviridae* et l'activité antivirale de l'EGCG est confirmée avec 6 géotypes différents sur les VHCpp. Il a également été observé que l'EGCG cible directement la particule virale (Calland et al., 2012).

Ces deux articles publiés simultanément et indépendamment l'un de l'autre permettent de confirmer que l'EGCG inhibe bien l'étape d'entrée du VHC. Cependant, des résultats contradictoires ont été publiés par d'autres équipes. Deux équipes ont montré que l'EGCG pouvait avoir un effet sur l'étape de réplication du VHC. En 2007, Zuo et ses collaborateurs ont montré *in vitro* que l'EGCG pouvait interagir et inhiber la protéase NS3 (Zuo et al., 2007). Puis en 2012, Chen et ses collaborateurs ont aussi montré que l'EGCG pouvait inhiber la protéase NS3 mais également la RdRp NS5B (Chen et al., 2012).

Il a été montré que l'EGCG inhibait l'étape de liaison du virus aux héparanes sulfates (Colpitts and Schang 2014). L'inhibition de la propagation du virus selon le mode de transmission cellule-cellule a été confirmé par l'équipe de Roh et ses collaborateurs (Roh et al., 2011). Cette propriété de l'EGCG est intéressante car elle permettrait de réduire le développement des tumeurs chez les patients cirrhotiques (Halegoua-De Marzio et al., 2012). Il peut également être envisagé que l'EGCG soit utilisé lors de greffes du foie pour essayer de limiter la propagation virale au greffon.

II.5.b La delphinidine

La delphinidine (Figure 27) est un flavonoïde appartenant à la classe des anthocyanidines. Peu d'études scientifiques se sont intéressées directement à la delphinidine, mais davantage se sont intéressées aux anthocyanines (Afaq et al., 2007).

Les anthocyanines forment un grand groupe de composés chromophores. En effet, ils sont responsables des pigments bleus, violets et rouges de beaucoup de plantes et contribuent ainsi à développer l'attractivité de la plante envers les insectes pollinisateurs. Ces couleurs confèrent également un effet protecteur à la plante. La delphinidine est présente en quantité importante dans les fruits rouges comme la framboise, le cassis, la myrtille et les groseilles.

II.5.b.i Pharmacocinétique

Les anthocyanines correspondent à la forme glycosylée des anthocyanidines. Elles apparaissent intactes, méthylées, conjuguées par sulfatation et associées à des glucuronides dans les urines et dans la circulation sanguine (Mullen et al., 2010; Talevera et al., 2005 ; Kay et al., 2005). Les modèles animaux suggèrent que les anthocyanines apparaissent dans le sang entre 6 et 20 min après leur consommation. La concentration sanguine maximale de ces molécules est atteinte après 15 à 180 min, ceci étant dépendant de chaque individu (Matsumoto et al., 2005, 2006).

Des études ont montré que les anthocyanines étaient rapidement absorbées au niveau de l'estomac et du petit intestin chez les rats (He et al., 2009), visibles par l'intense couleur rouge retrouvée dans les tissus après dissection. Les anthocyanines sont fortement absorbées dans l'intestin au niveau du jejunum et au niveau du duodenum. En revanche, l'absorption semble limitée au niveau de l'ileum et inexistante au niveau du colon (Matuschek et al., 2006). Chez les rats, les anthocyanines sont absorbées rapidement, en 36 min, alors que leur disponibilité dans les tissus cibles semble être limitée (Vanzo et al., 2011 ; He and Guisti et al., 2010). Après 15 jours d'un apport enrichi en mûre, chez les rats, les taux d'anthocyanines ont été mesurés dans différents tissus. Les anthocyanines ont été détectées à 10,13% dans le tissu de l'estomac, 89,30% dans le jejunum, 0,06% dans le foie, 0,48% dans le rein et 0,04% dans le cerveau (Talavera et al., 2005 ; Manach et al., 2005 ; Williamson et al., 2005 ; Czank et al., 2013).

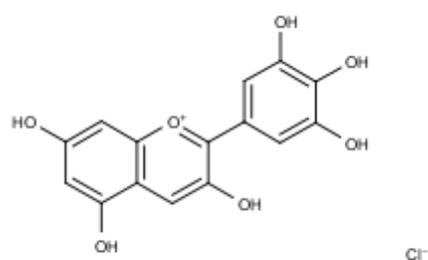


Figure 27: Structure chimique du chlorure de delphinidine

Une étude clinique menée sur des individus volontaires a montré qu'après la consommation de 300g de framboise, les anthocyanines ou leurs métabolites ne sont pas détectables dans le plasma des individus (Gonzales-Barrio et al., 2010). Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de Perez-Jiménez qui s'est intéressée aux métabolites de polyphénols, qui sont retrouvés dans les urines à 0,02-0,06% (Perez-Jimenez et al., 2010). Les anthocyanines semblent être rapidement dégradées par la microflore intestinale (Milbury et al., 2010).

II.5.b.ii Effets bénéfiques chez l'homme

La delphinidine a des effets anticarcinogènes (Pal et al., 2013 ; Keravis et al., 2015) notamment sur le cancer du sein (Patidar et al., 2016 ; Aiyer et al., 2012) et de la prostate (Jeong et al., 2016 ; Lee et al., 2016 ; Guo et al., 2016). Les anthocyanines ont des effets bénéfiques sur les maladies cardiovasculaires (Bagchi et al., 2003 ; Wallace et al., 2016) et les maladies neurodégénératives (Kim et al., 2009 ; Rendeiro et al., 2012). Cette famille de molécules a également des activités antimicrobiennes (Cesoniene et al., 2009 ; Cisowska et al., 2011) sur l'entérobactérie *Escherichia coli*, sur les bactéries du genre *Salmonella* (Nohynek et al., 2006), mais aussi de *Citrobacter* et *Enterococcus* (Cesoniene et al., 2009). Les effets antiviraux de la delphinidine ont été peu décrits.

Un exemple de dérivé commercial des anthocyanidines est le delphinol[®], un produit à base de delphinidine extraite des baies de Maqui (*Aristotelia chilensis* Eléorcapacées) principalement présentes au Chili. Ce produit est vendu comme étant bénéfique pour la régulation du glucose chez les individus (Hidalgo et al., 2014, Watson et al., 2015).

III. Les plantes extrêmophiles comme source de nouvelles molécules

Le stress subi par les plantes, lors de conditions drastiques de sécheresse et de salinité, a un impact sur la qualité des cultures et leur rendement (Ksouri et al., 2010). Les plantes halophytes et xérophytes, qui se développent dans des conditions importantes de salinité et de sécheresse, respectivement, mettent en place d'importants

mécanismes d'adaptation à leur environnement (Ksouri et al., 2008). Les plantes halophytes sont retrouvées principalement sur les dunes de sables, les côtes rocheuses, dans les eaux stagnantes salées des déserts et dans les marais salants. Dans le monde, plus de 2500 espèces végétales ayant une grande tolérance à la salinité ont été recensées (Abdelly et al., 2006). En Tunisie par exemple, 10% du territoire est affecté par de fortes concentrations en sel. Les plantes présentes dans ces écosystèmes ont la capacité d'accumuler de grandes quantités de sodium et de produire des molécules et composants favorables à leur développement (Abdelly et al., 2011). De nombreuses plantes halophytes sont utilisées en médecine traditionnelle et ont un effet bénéfique sur l'Homme et les animaux. Ces plantes semblent être une source de biocomposés spécifiques dont leurs bioactivités sont très étudiées.

III.1 Exemple : le *Juncus maritimus*

III.1.a Description botanique

Le *J. maritimus*, plus communément appelé jonc de mer, appartient à la famille des Juncaceae et au genre *Juncus*. C'est une plante vivace atteignant généralement 1 mètre de hauteur. Elle a des rhizomes traçants, ses tiges sont raides, nues et rassemblées en touffes. Les feuilles sont peu nombreuses et égalent la taille des tiges, elles sont dressées, cylindriques et piquantes (Figure 28). La floraison a lieu de juin à octobre. Les fleurs sont de couleur vert pâle.

III.1.b Distribution et écologie

Cette plante poussant dans les milieux humides est présente sur les côtes marécageuses en Europe, Asie, Afrique et Amérique. Pour se développer, le *J. maritimus* Lam a besoin de beaucoup de lumière, d'humidité et de chaleur. Le sol dans lequel la plante va pousser doit être basique, moyennement humide, argileux et riche en nutriments. Cette plante est tolérante à une forte salinité (Tela botanica 2011), elle s'adapte bien aux changements environnementaux et est capable de pousser dans des sols très pollués (Gil et al 2014 ; Boscaiu et al., 2013). Le jonc de mer est utilisé

traditionnellement en vannerie pour tresser des paniers ou des tapis. En France le *J. maritimus* est principalement présent le long du littoral côtier.

III.1.c Rôle du *J. maritimus*

En 2010, une équipe a étudié la capacité de certaines espèces de plantes maritimes à filtrer et traiter de l'eau plus ou moins stagnante dans laquelle elles poussaient. Le *J. maritimus* a la capacité de développer fortement ses racines, d'environ 40 cm de longueur (Pavan et al., 2015). Cette caractéristique lui permet d'accumuler une grande concentration de composés « toxiques » dans ses racines et rizhomes.

Cette propriété pourrait permettre de changer la distribution en métaux dans les sols des estuaires et plus particulièrement la distribution de cadmium. Le cadmium est un métal qui, présent en trop grande quantité, provoque des problèmes de santé tels que des maladies rénales ou pulmonaires. Les plantes poussant sur des sols riches en cadmium peuvent être néfastes pour les animaux qui les consomment. En effet, il est montré que dans les systèmes aquatiques, les moules, les huîtres et les crevettes peuvent être fortement contaminées en cadmium, cuivre (Montenegro et al., 2016) et zinc (Almedia et al., 2004 ; Almedia et al., 2005 ; Almedia et al., 2006 ; Almedia et al., 2014).



Figure 28: Illustration botanique du *J. maritimus* (Dictionnaire des Sciences Animales) A : Fleurs, B, Tiges C: Capsule déhiscente, D: Carpelle, E : Tépale

Le *J. maritimus* peut également accumuler dans ses racines et rhizomes de grandes quantités de mercure mais aussi d'hydrocarbures de pétrole présents dans les estuaires (Ribeiro et al., 2011 ; Ribeiro et al., 2013 ; Ribeiro et al., 2014 ; Marques et al., 2011). La présence du *J. maritimus* inhibe la capacité d'autres plantes à accumuler les hydrocarbures de carbone dans leurs racines (Couto et al., 2011, Ribeiro et al., 2015). Ces propriétés ont permis à cette espèce maritime de survivre dans les marais espagnols ou portugais fortement pollués ces cinquante dernières années (Castro et al., 2009, Cleary et al., 2012, Anjum et al., 2014). La colonisation de cette espèce dans certains espaces aquatiques a provoqué un déséquilibre de l'écosystème des marais, ne permettant pas le retour de certains animaux aquatiques (Valega et al., 2008)

Plusieurs études ont caractérisé les molécules spécifiques des plantes du genre *Juncus*. Le produit naturel dehydrojuncusol a été identifié pour la première fois en 2007 à partir du *J. acutus* (Behery et al., 2007 ; Behary et al., 2013). Sa présence a également été mise en évidence à partir du *J. effusus* en 2012 (Wang et al., 2012 ; Ishiuchi et al., 2015) et à partir du *J. inflexus* en 2016 (Toth et al., 2016). Il a été montré que le déhydrojuncusol présent dans le *J. effusus* pouvait induire de la cytotoxicité dans les cellules HT22 (Ishuchi et al., 2015). Jusqu'à présent, ses effets sur des bactéries, virus ou encore sur la santé humaine n'ont pas été étudiés.

Contexte

Les traitements actuels pour lutter contre le VHC se basent essentiellement sur les DAAs commercialisés à partir de 2014. La synthèse chimique, le processus de développement, de production et de mise sur le marché de ces molécules pharmaceutiques sont très longs, rendant les traitements très onéreux. En effet en 2014, le sofosbuvir, molécule centrale de ces nouveaux traitements, coûtait 19000 euros en boîte de 28 comprimés. Mais pour pouvoir bénéficier du traitement le plus court avec cette molécule, long de 12 semaines, trois boîtes sont nécessaires. Ces coûts exorbitants rendent difficile la prise en charge de ces nouvelles molécules par les systèmes de santé dans les pays développés, et le traitement est même inaccessible dans les pays en voie de développement. Par ailleurs, chez certains patients, l'apparition de virus résistants à ces DAAs a été observée, rendant les traitements inefficaces.

Depuis quelques temps un effort économique important est demandé aux industries pharmaceutiques commercialisant ces DAAs, afin de rendre accessible ces molécules au plus grand nombre de patients. En France, un accès universel a été déclaré pour ces molécules à tous les patients en mai 2016. Cependant dans les faits, certains patients sont privilégiés par rapport à d'autres car la quantité de médicament disponible est inférieure au nombre de patients.

Ces DAAs, agissant directement contre le virus, ciblent une seule étape du cycle viral : la réplication. La combinaison de molécules pouvant cibler différentes étapes du cycle viral pourrait permettre de lutter plus efficacement contre le VHC et de réduire l'apparition de virus résistants. Identifier de nouveaux inhibiteurs du VHC afin de diminuer le coût des traitements et les rendre plus efficaces est donc toujours nécessaire.

Les plantes utilisées en médecine traditionnelle sont une source intéressante de molécules bioactives. De plus, si certaines molécules s'avèrent efficaces contre le VHC, leur coût d'extraction sera plus faible que celui des molécules synthétiques. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux propriétés anti-VHC de l'EGCG présent dans le thé vert et de la delphinidine, présente principalement dans les fruits rouges. Les propriétés antivirales du *J. maritimus* Lam et de plantes médicinales Ivoiriennes ont également été étudiées.

Objectifs

Partie 1 : Nouveau mécanisme d'action de polyphénols inhibant l'entrée du VHC

Une première étude publiée dans le laboratoire en 2012 (Calland et al., 2012) a permis d'identifier l'EGCG, molécule extraite du thé vert appartenant à la famille des tanins, comme étant un nouvel inhibiteur de l'entrée du VHC. L'EGCG agit de manière pangénotypique, en bloquant l'étape d'attachement du virus à la surface cellulaire. Cette molécule agit directement sur la particule virale et de manière dose dépendante sur l'entrée avec une EC₅₀ de 5 µM. L'EGCG inhibe également la transmission du virus selon le mode cellule-cellule mais aussi selon le mode de transmission classique, par le surnageant cellulaire. En cherchant des molécules similaires à l'EGCG ayant une meilleure capacité antivirale, l'équipe de Karin Séron avec Noémie Calland alors étudiante en thèse, a mis en évidence la delphinidine, une molécule appartenant également à la famille des flavonoïdes. Cette molécule, comme l'EGCG, inhibe l'entrée du VHC en empêchant l'attachement du virus à la surface cellulaire.

L'objectif de mon travail de thèse a été de comprendre le mécanisme d'action de l'EGCG et de la delphinidine sur le VHC. Pour cela, trois hypothèses ont été émises : (1) soit les molécules altèrent ou détruisent les particules virales, (2) soit elles agrègent les particules virales les empêchant ainsi de se fixer à la surface cellulaire, (3) soit elles recouvrent la particule virale, masquant les épitopes nécessaires à la liaison des particules virales à la surface cellulaire.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet de la publication suivante :

Noémie Calland*, **Marie-Emmanuelle Sahuc***, Sandrine Belouzard, Véronique Pène, Pierre Bonnafous, Ahmed Atef Mesalam, Gaspard Deloison, Véronique Descamps, Sevser Sahpaz, Czeslaw Wychowski, Olivier Lambert, Priscille Brodin, Gilles Duverlie, Philip Meuleman, Arielle R. Rosenberg, Jean Dubuisson, Yves Rouillé, Karin Séron.

Polyphenols Inhibit Hepatitis C Virus Entry by a New Mechanism of Action

J Virol (2015) 89:10053–10063. *co- premier auteur

Partie 2 : Identification du déhydrojuncusol, un composé naturel extrait du *J. maritimus*, comme nouvel inhibiteur de la réplication du VHC

Les plantes extrémophiles sont une source intéressante de molécules bioactives. Dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Sevser Sahpaz et le Dr. Céline Rivière du laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Lille, nous avons effectué un fractionnement bio-guidé de huit plantes extrémophiles Tunisiennes en recherchant une activité anti-VHC. Le fractionnement a été effectué par une étudiante en thèse, Ramla Sahli, en co-tutelle avec le laboratoire de Pharmacognosie de Lille et le Laboratoire des plantes aromatiques et médicinales du Centre de Biothechnologie Borj-Cédria (CBBC) en Tunisie. Après le criblage des extraits de plantes et des fractions obtenues contre le VHC, nous nous sommes très vite intéressées à l'extrait de rhizomes de *J. maritimus* Lam qui était le plus actif contre le VHC. De manière intéressante, parmi les huit plantes extrémophiles Tunisiennes, l'extrait de rhizomes de *J. maritimus* Lam a également montré une activité anti-bactérienne contre *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus pyrogenes* (Sahli et al., 2016).

L'objectif de cette seconde partie de mon projet de thèse a été d'identifier le principe actif présent dans l'extrait de rhizome de *J. maritimus* et de comprendre le mécanisme d'action de ce composé sur le cycle infectieux du VHC.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet de la publication suivante :

Sahuc ME*, Sahli R*, Sahpaz S, Rouillé Y, Rivière C, Séron K. **Dehydrojuncusol extracted from *Juncus maritimus* is a new inhibitor of HCV replication** * co- first author

Toujours en étroite collaboration avec le laboratoire de Pharmacognosie de Lille, mais cette fois-ci avec le groupe du Dr Simon Bordage et Moussa Bamba, étudiant en thèse, un fractionnement bio-guidé de plantes Ivoiriennes utilisées en médecine traditionnelle contre les jaunisses et les affections hépatiques a été entrepris. Le but est d'identifier des extraits de plantes actifs contre le VHC et si possible d'isoler les principes actifs.

Résultats

Partie 1 :

**Nouveau mécanisme d'action
de polyphénols inhibant
l'entrée du VHC**

Noémie Calland*, **Marie-Emmanuelle Sahuc***, Sandrine Belouzard, Véronique Pène, Pierre Bonnafous, Ahmed Atef Mesalam, Gaspard Deloison, Véronique Descamps, Sevser Sahpaz, Czeslaw Wychowski, Olivier Lambert, Priscille Brodin, Gilles Duverlie, Philip Meuleman, Arielle R. Rosenberg, Jean Dubuisson, Yves Rouillé, Karin Séron.

Polyphenols Inhibit Hepatitis C Virus Entry by a New Mechanism of Action

J Virol (2015) 89:10053–10063. *co- first author

Afin d'aller plus loin dans la compréhension du mécanisme d'action de l'EGCG et de la delphinidine nous avons continué d'explorer les différentes hypothèses citées précédemment.

D'après nos expériences, la déformation des VHCpp observée en présence d'EGCG et de delphinidine est dépendante des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2. Nous nous sommes demandés si cette déformation pouvait être due au pouvoir agrégeant de l'EGCG et de la delphinidine sur les protéines d'enveloppe. En 1993, une étude a montré que l'EGCG agrège les particules virales du virus de l'influenza, diminuant ainsi l'infectiosité de ce virus (Nakayama et al., 1993). Dans notre cas, sur les images de cryo-microscopie électronique, les particules virales ne s'agrègent pas. Ces résultats ont été confirmés sur le VHCcc en réalisant des gradients de vélocité. Si l'EGCG et la delphinidine n'agrègent pas les particules virales, elles peuvent agréger directement les protéines d'enveloppe à la surface du virion.

Nous avons d'abord réalisé des expériences d'agrégation avec la glycoprotéine d'enveloppe E2 soluble délétée de son fragment transmembranaire, produite en culture cellulaire à partir de cellules HEK-293T (selon la méthode de Thomas Krey (Krey et al., 2010), et incubée avec nos molécules à différentes concentrations. Nous nous avons observé une agrégation de la protéine E2 en présence d'EGCG et de delphinidine. Cependant, les résultats obtenus étaient difficilement quantifiables. Nous avons confirmé nos résultats après ultracentrifugation du complexe protéine E2-molécule dans des gradients de sucrose. Le DMSO et la pétunidine ont été utilisés comme contrôle. Le DMSO est le solvant servant à suspendre les molécules, tandis que la pétunidine est une molécule ayant une structure très proche de la delphinidine mais n'ayant pas d'effet sur l'infection du VHC (Calland et al., 2015). Ceci nous a permis d'observer par Western Blot une agrégation de E2 sous forme de dimères avec l'EGCG la delphinidine, et des formes multimériques avec la delphinidine (Figure 1).

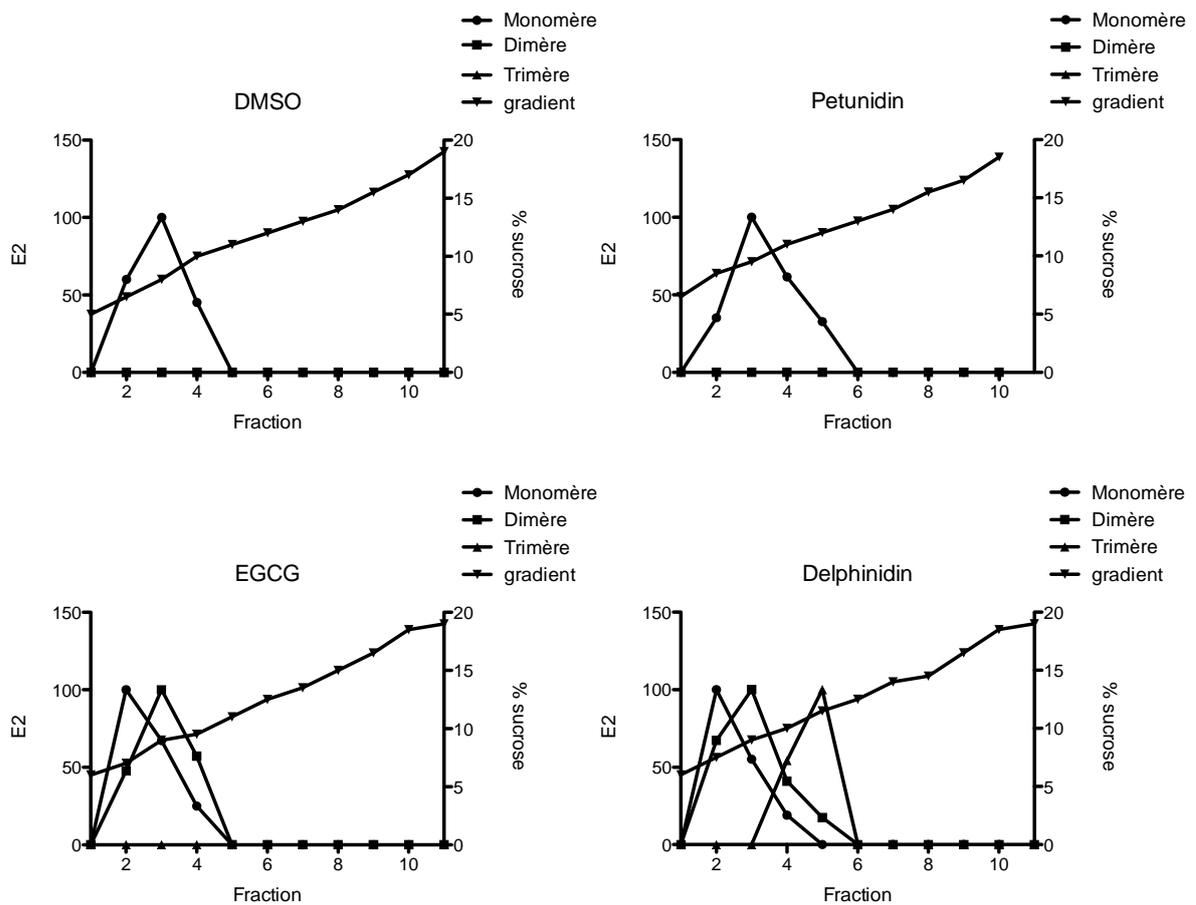


Figure 1: Agrégation de E2 en gradient de sucrose en présence de DMSO, d'EGCG, delphinidine et pétunidine. E2 soluble est incubé pendant 1h à 37°C avec soit 250 μ M d'EGCG, soit 250 μ M de delphinidine, soit 250 μ M de pétunidine ou soit du DMSO. Puis l'ensemble est déposé à la surface de gradient de sucrose continu 5-20%. Les gradients sont ultracentrifugés pendant 16h à 100000g. Chaque gradient est ensuite séparé en 10 fractions, et pour chacune des fractions E2 est détectée par Western-blot. Les signaux obtenus sont quantifiés avec le logiciel ImaJ.

Parallèlement à ces expériences, nous nous sommes attachés à déterminer s'il y avait une interaction directe entre les glycoprotéines d'enveloppe et les molécules d'intérêt EGCG et delphinidine.

Après production de la protéine E2 en modèle drosophile selon la méthode de Thomas Krey, nous avons regardé par RMN s'il y avait une interaction entre la protéine E2 et l'EGCG. Ces expériences ont été réalisées avec le laboratoire de glycobiologie structurale et fonctionnelle (CNRS, UMR 8576) plus particulièrement avec le Dr Hanouille et le Dr Guerardel. Nous avons travaillé avec de l'EGCG-difluoré (Bhat et al., 2014) car en cas d'interaction entre l'EGCG et la protéine E2, le fluor est plus facilement visualisable sur les spectres de RMN que l'hydrogène. Nous n'avons pas pu travailler avec la delphinidine, car cette molécule n'est pas assez stable dans le temps et par conséquent aurait donné plusieurs pics en RMN.

Nous avons observé une interaction entre la glycoprotéine E2 et l'EGCG avec un ratio de l'ordre de 1/200. Ce type d'interaction très fort entre l'EGCG et E2 ne permet pas de réaliser des doses réponses. Cependant, nous avons voulu comprendre si une telle interaction pouvait être due à la partie glycanique de E2 plus qu'à la partie protéique. Pour cela, la fraction glycanique de E2 a été isolée après déglycosylation de la protéine. Il n'a pas été possible d'obtenir la partie protéique de E2 « pure », sans glycanes, car il est difficile d'obtenir une déglycosylation efficace à 100% et il peut donc rester quelques glycanes sur la protéine. Nous avons observé, par RMN, une interaction de l'EGCG avec la partie glycanique de E2 et également avec la partie protéique. Ces résultats montrent que l'EGCG semble interagir avec les glycanes de la protéine mais une interaction avec la partie protéique de E2 ne peut pas être exclue.

Partie 2 :

Identification du
déhydrojuncusol, un composé
naturel extrait du *J.*
maritimus, un nouvel
inhibiteur de la réplication
du VHC

Dehydrojuncusol, a natural phenanthrene compound extracted from *Juncus maritimus* is a new inhibitor of hepatitis C virus replication

Marie-Emmanuelle Sahuc^{1*}, Ramla Sahli^{2,3*}, Céline Rivière², Véronique Pène⁴, Muriel Lavie¹, Abderrazak Smaoui³, Arielle Rosenberg⁴, Jean Dubuisson¹, Riadh Ksouri³, Yves Rouillé¹, Sevser Sahpaz², Karin Séron¹

¹CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 –F-59000 Lille, France, ²ICV - Institut Charles Viollette, Univ. Lille, INRA, ISA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d’Opale, EA 7394 , F-59000 Lille, France, ³Laboratory of Aromatic and Medicinal Plants, Biotechnology Centre of Borj-Cédria (CBBC), Hammam-lif, Tunisia, ⁴Univ. Paris Descartes, EA4474 “Hepatitis C Virology”, F-75014 Paris, France.

* Equal contribution

Corresponding author: Karin Séron, Molecular & Cellular Virology, CIIL, INSERM (U1019) & CNRS (UMR8204), Institut Pasteur de Lille, Bâtiment IBL, 1 rue Calmette, CS50447, 59021 Lille cedex, France. Tel: (+33) 3 20 87 11 99; Fax: (+33) 3 20 87 12 01; E-mail: karin.seron@ibl.cnrs.fr

Keywords Hepatitis C, antiviral agent, natural compound, phenanthrene, dehydrojuncusol

Abstract

Hepatitis C virus (HCV), causing hepatitis C, is present in approximately 170 million people worldwide. Recent emergence of direct acting antivirals (DAAs) targeting HCV proteins, has considerably enhanced the success of antiviral therapy. However, the apparition of DAA resistant-associated variants is a cause of treatment failure. The cost of the therapy is extremely high and not accessible in countries with inadequate medical infrastructures. Therefore search for new inhibitors and with lower cost of production, like natural compounds, should be pursued. In this context, sixteen crude methanolic extracts of extremophile plants from Tunisia were screened against HCV in cell culture. Infection rates in Huh-7 hepatoma cells were investigated by indirect immunofluorescence assay. The rhizome crude extract of *Juncus maritimus* Lam., exhibited the highest antiviral activity. Bio-guided fractionation showed that the methylene chloride partition was most likely responsible for this activity. Among the compounds isolated and identified from this partition, dehydrojuncusol, was the most active. A time-addition assay showed that dehydrojuncusol significantly inhibited HCV infection when added during the post-inoculation step ($EC_{50} = 1.31 \mu\text{M}$). Inhibition of HCV replication was confirmed using a cell line stably expressing a HCV subgenomic replicon. No *in vitro* toxicity on Huh-7 cells at active concentrations was observed and no effect on HCV pseudoparticule entry. Antiviral activity of dehydrojuncusol was also demonstrated in primary human hepatocytes, the most relevant human pre-clinical model for HCV infection. Interestingly, dehydrojuncusol was able to inhibit replication of two frequent daclatasvir resistant mutants (carrying the mutations L31M or Y93H in NS5A). Finally, two linked mutations in NS5A (T24S-L31M) were identified in dehydrojuncusol resistant mutants and were shown to confer partial resistance to the drug. In conclusion, dehydrojuncusol, a natural compound, extracted from *J. maritimus*, inhibits HCV replication and is active against HCV resistant variants frequently found in patients with treatment failure, and may target the viral protein NS5.

Introduction

Hepatitis C is a major cause of chronic hepatitis often associated with complications, such as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Levrero, 2006; Messina et al., 2015). Approximately 170 million people are infected with hepatitis C virus (HCV) worldwide (Lavanchy, 2011). To date no vaccine is available against HCV, mainly due to the diversity of viral isolates (Tarr et al., 2015). In recent decades, various treatments have been established. Before 2011, a standard therapy combining pegylated interferon alpha and ribavirin (a guanosine analogue) was administered to patients (Liang and Ghany, 2013). The first direct-acting antiviral agents (DAA), targeting the NS3/4A protease activity, effective only against genotype 1 HCV-infected patients and inducing side effects, were released in 2011. Since then, other viral proteins have been targeted like RdRp NS5B and NS5A, a protein involved in replication and assembly of the virus but with no enzymatic activity. New inhibitors have been marketed with high rates of sustained virologic response against all genotypes and very few side effects (Pawlotsky, 2014). However, these treatments are very expensive and not accessible to all people infected (Graham and Swan, 2015). Moreover, there is a risk of selecting viral variants resistant to DAA leading to failure of the therapy, which will require new treatments (Pawlotsky, 2016).

HCV, a member of the *Flaviviridae* family, is an enveloped, single stranded RNA virus (Lindenbach et al., 2007) encoding for a single polyprotein which is cleaved co- and post-translationally in ten proteins. Structural proteins are components of infectious viral particles, whereas non-structural proteins are involved in the replication of the viral genome and the production of new infectious particles in infected cells. The HCV life cycle can be divided into three major steps: entry, replication, and assembly/release. At each step, different sets of viral proteins and host factors are involved. HCV entry (Bartosch and Dubuisson, 2010) is a complex mechanism initiated first by the binding of particles to non-specific and specific entry factors, then endocytosis and fusion of viral envelope and the endosomal membrane leading to release of viral RNA genome into the cytoplasm. Viral envelope proteins E1 and E2 are involved in the entry process. The replication of the RNA genome takes place in the 'membranous web' which are endoplasmic reticulum rearranged membranes (Egger et al., 2002). The replication complex is composed of viral proteins NS3/4A, NS4B, NS5A and NS5B. Finally, new virions assemble in association with lipid droplets (Miyanari et al., 2007),

bud into the endoplasmic reticulum and infectious viral particles are secreted out of the cells via the secretory pathway.

The present hepatitis C therapy is very efficient but lead to the apparition of resistant associated substitutions (RASs). Some of the RASs are specific to a DAA, this is the case for NS5B RASs but some of them appear independently of the DAA used, especially for NS3/4A and NS5A RASs (Sarrazin, 2016). Patients with NS5A resistant variant are very difficult to treat and re-treatment with a combination of anti-NS5B and anti-NS5A antiviral does not always lead to a high sustained antiviral response. Moreover, these mutated viruses are persistent for years in blood serum (Pawlotsky, 2016). Lack of alternative therapy might be a problem for these patients in the future.

Natural products from plant species maintain a strong position in the drug discovery (Newman and Cragg, 2012). Between 1981 and 2010 marketed molecules with plant origin had antimicrobial activities. A number of metabolites found in plants, among which are the phenolic compounds, are being cited as antimicrobials and resistance-modifying agents (Abreu et al., 2012; Gibbons, 2004). If the artemisinin derivatives are well known for their antimalarial activity, researchers continue to study plant-derived natural products as source of new antimalarial drugs to fight emerging multidrug resistant strains of malaria parasites, including synthetic analogues of natural compounds (Wright, 2010). In fact, even if natural products are not always used directly as medicines, they often remain a source of inspiration for medicinal chemistry, with semisynthetic modifications, or pharmacophore with natural origin (Newman and Cragg, 2012). Extremophile plants either xerophytes (growing in arid climate), or halophytes (growing in saline soils) are natural reservoirs of rare bioactive compounds. To live in this environment, the plants should be able to develop several physiological, biochemical and molecular mechanisms, including biosynthesis of osmolytes and bioactive molecules enzymatic or not enzymatic. By these molecular mechanisms, extremophile plants can resist to abiotic stresses and to infections by producing phytoalexins (Ksouri, 2012). Rare compounds with unique or common chemical structure present in extremophile plants might help to identify new DAA against HCV with unexpected mechanism of action.

Numerous DAA from natural origin are now described and are able to target different steps of HCV infectious cycle (Calland et al., 2012). Crude extracts from plants used in traditional medicine are also promising source of antiviral molecules. However, only silymarin, a standardized extract of Milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn., Asteraceae) and some of its metabolites, silibinin A and B, a mixture of two diastereoisomers of flavonolignans, are

developed in clinical trials to be used in hepatitis C infected patients (Polyak et al., 2013). It is estimated that the new DAA therapy against hepatitis C will benefit to a very small part of the patients (Hajarizadeh et al., 2013). The use of plant extracts or compounds isolated from these extracts should render the therapy more accessible to many patients in developing countries. Therefore search for such compounds and extracts is still needed to treat the vast majority of the patients in the coming decades. In this context, we have screened halophyte and xerophyte plant extracts from Tunisia for their anti-HCV activity. This led us to identify *Juncus maritimus* rhizome extract for its capacity to inhibit HCV infection (Sahli et al., in press). Thanks to a bio-guided fractionation approach, dehydrojuncusol, the active compound inhibiting HCV infection was identified and its mechanism of action against HCV replication characterized.

Materials and methods

Chemicals

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Opti-MEM, phosphate buffered saline (PBS), glutamax-I, fetal bovine serum were purchased from Eurobio. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) was from Molecular Probes (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA). EGCG was from Calbiochem (MerckChemicals, Darmstadt, Germany) and was >95% pure. Delphinidin chloride was from Extrasynthèse (Lyon, France) and was >96% pure. Daclatasvir (BMS-790052) was from Selleckchem (France). Stocks of EGCG and delphinidin were resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO) at 0.5 M. Plant extracts were resuspended in DMSO at 25 mg/mL. Boceprevir was kindly provided by Philippe Halfon (Hôpital Européen, Laboratoire Alphabio, Marseille, France). Other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO).

Antibodies

The anti-E1 monoclonal antibody (A4) (Dubuisson et al., 1994), anti-yellow fever virus (YFV) envelope protein 2D12 antibody and anti-bovine viral diarrhea virus (BVDV) NS3 protein OSC-23 antibody were produced *in vitro* by using MiniPerm apparatus (Heraeus, Hanau, Germany). The anti-NS5A (2F6/G11) was from Austral Biologicals (San Ramon, USA). Mouse anti- β tubulin Mab (TUB 2.1) was from Sigma. Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG and peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies were from Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, USA).

Cells and culture conditions

Huh-7 (Nakabayashi et al., 1982) and HEK 293T (ATCC number CRL-11268) were grown in DMEM supplemented with glutaMAX-I and 10% fetal bovine serum (complete culture medium), and Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK; ATCC number CCL-22) in DMEM supplemented with glutaMAX-I and 10% horse serum in an incubator at 37°C with 5% CO₂. The primary human hepatocytes were from (Biopredic International, Saint-Grégoire, France) and maintained in primary culture as described previously (Calland et al., 2015) (Podevin et al., 2010).

Collection of plant, extraction and purification of natural products

Juncus maritimus rhizomes were collected in October 2013 from a coastal region in the North-East of Tunisia (Soliman) and a voucher specimen (184) was deposited at the Herbarium of the Laboratory of Extremophile Plants at the Biotechnology Centre (Technopark of Borj-Cédria). Dried and powdered rhizomes were soaked in methanol (15 mL/g; 1 x 24 h; 2 x 48 h) to afford 300.0 g of a crude methanolic extract. A part of the extract (215.0 g) was dissolved in water and then partitioned with methylene chloride (CH₂Cl₂) to afford a CH₂Cl₂ partition (15.0 g). Preparative Centrifugal Partition Chromatography (CPC) (Armen Instrument) was carried out on CH₂Cl₂ partition (1.45 g) using a quaternary biphasic solvent system Arizona X (n-Hept/EtOAc/MeOH/H₂O; 9:1:9:1; v/v/v/v) in ascending mode for 30 min. Fifteen fractions (MCX1 to MCX15) were pooled according to TLC and UV analysis. Compounds 1 (22.2 mg), 2 (25.9 mg) and 3 (1.4 mg) were isolated from MCX15 (200 mg) by preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Shimadzu instrument) using the following elution program (EP1): 10-38% B (0-2 min), 38-45% B (2-8 min), 45-51% B (8-25 min), 51-96% B (25-26 min), 96%-96.1% B (26-29 min), 100% B (29-35 min). Preparative HPLC was conducted on the fraction MCX12 (97.6 mg) to give compound 4 (18 mg) using the following elution program (EP2): 10-40% B (0-2 min), 40-96% B (2-8 min), 96-96.2% B (8-29 min), 100% B (29-30 min). Compound 5 was obtained through another preparative CPC (Arizona R: n-Hept/EtOAc/MeOH/H₂O; 2:1:2:1; v/v/v/v). 15 fractions (MCR1 to MCR15) were obtained by this process from the CH₂Cl₂ partition (1.4 g). Further successive purifications using semi-preparative and preparative HPLC (EP2) from the fraction MCR4 (44.2 mg) were required to isolate compound 5 (2.3 mg).

HCVcc

We used a modified JFH1 strain (Japanese Fulminant Hepatitis-1, genotype 2a) containing cell culture adaptive mutations (Delgrange et al., 2007; Goueslain et al., 2010). The viral stock was produced in Huh-7 cells. Huh-7 cells were infected with a pre-stock of HCVcc in flasks. After 24h, 48h and 72h the supernatants of flasks were collected. The titer of the stock was 5.10^6 focus forming unit (ffu)/ml. For infection assay, Huh-7 cells, 6000/well, seeded in 96-well plate were inoculated with HCVcc at a multiplicity of infection (MOI) of 0.8 during 2h at 37°C then the inoculum was removed and cells were incubated in complete culture medium for 28h at 37°C. Compounds were added to cells at 25 µg/ml either for 2h at 37°C before infection (preincubation condition), for 2h at 37°C in the presence of the virus (inoculation condition), for 28h at 37°C after virus removal (post-inoculation condition) or both during the 2h infection and 28h post-infection periods (inoculation and post-inoculation condition). Cells were fixed with ice-cold methanol and subjected to immunofluorescent detection of viral E1 envelope protein.

HCV grown in primary culture (HCVpc)

For HCV infection, PHH were inoculated 3 days post-seeding at a MOI of 5 with a non-modified JFH1 virus (HCVcc), as previously described (Podevin et al., 2010). After 6-h incubation at 37°C, the inoculum was removed, and monolayers were washed 3 times with PBS. Supernatants containing infectious HCVpc were harvested 2 days later, and infectious titers were evaluated by a focus-forming assay on Huh-7 cells as previously described (Pène et al., 2009).

BVDV and YFV

Bovine viral diarrhea virus (BVDV, strain NADL) was produced in MDCK cells as previously described (Lecot et al., 2005). Yellow fever virus (YFV, strain 17D) was produced in SW13 cells. Infection assays were performed with MDBK cells (BVDV) or Huh-7 cells (YFV) seeded 96-well plates, at a multiplicity of infection (MOI) of 1.5 or 1, respectively. Cells were infected for 1 hour at 37°C. The viral inoculum was removed and the cells were further cultured for either 15 hours (BVDV) or 23 hours (YFV). Cells were fixed with paraformaldehyde 3% in PBS and subjected to immunofluorescent detection of NS3 (BVDV) or E (YFV).

HCV particle pseudotyped (HCVpp)

Retroviral pseudoparticles expressing HCV envelope glycoproteins E1E2 of genotype 2a (HCVpp) were produced in HEK-293T cells as described (Bartosch et al., 2003). Huh-7 cells were seeded in 48-well plates and inoculated with HCVpp in the presence of compounds for 2h. Inoculum was removed and replaced with fresh medium without compound. Cells were lysed 48 hpi in 50 μ l of 1x Luciferase Lysis Buffer (Promega, Madison, USA) and luciferase activity was quantified in a Tristar LB 941 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) using luciferase Assay System (Promega) as recommended by the manufacturer.

Immunofluorescent detection assay

HCVcc, YFV and BVDV infected cells grown in 96-well plates were processed for immunofluorescence detection of viral proteins, as previously described (Rouillé et al., 2006). Nuclei were stained with 1 μ g/ml of DAPI, and infected cells were detected by immunofluorescent labeling of E1 envelope glycoprotein (HCV), E envelope protein (YFV) and NS3 protein (BVDV) followed by Cy3-conjugated anti-mouse secondary antibody. For BVDV and YFV infection assays, the plates were observed with an Axiophot microscope equipped with a 10X-magnification objective (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Fluorescent signals were collected with a Coolsnap ES camera (Photometrix, Kew, Australia). Images of infected cells (Cy3 channel) and of nuclei (DAPI channel) present in 20 randomly picked areas from each well were recorded. The number of total cells and of infected cells were quantified using ImageJ software. For quantification of HCVcc infection, confocal images were recorded with an automated confocal microscope IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare Life Sciences) using a 20x objective with exposure parameters 405/450 nm and 561/610 nm. Six fields per well were recorded. Each image was then processed using the Columbus image analysis software (Perkin Elmer). Nuclei were first segmented and the cytoplasm region was extrapolated based on the DAPI staining. Objects with a specific and predefined size were defined as cells. The ratio of infected cells over total cells represents the infection rate. For each virus, the number of cells per well and MOI were determined in order to have 30 to 40% of infected cells in control experiments with no inhibitor. Infection rates in DMSO controls were expressed as 100%.

Determination of the half maximal effective concentration (EC₅₀) of dehydrojuncusol

Huh-7 cells were inoculated for 2h at 37°C with HCVcc and the inoculum was removed and replaced with culture medium for 28h at 37°C in the presence of increasing concentrations of

dehydrojuncusol. Cells were fixed in iced-cold methanol and processed for immunofluorescent detection assay. EC₅₀ values were calculated with Graph Pad Prism software (Version 5.0b).

Viability Assay

Huh-7 cells were plated in 96-well plates at a density of 6.000 cells/well and then were incubated the next day in 100 µl of culture medium containing increasing concentrations of dehydrojuncusol for either 24, 48, or 72h. An MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium]-based viability assay (Cell Titer 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay, Promega) was realized as recommended by the manufacturer. The absorbance of formazan at 490 nm is detected using an ELISA plate reader (ELX 808 Bio-Tek Instruments Inc). Each measure was performed in triplicate.

HCV replicons

The plasmid pSGR-JFH1 encoding a sub-genomic replicon of JFH-1 strain was obtained from Dr T Wakita (Kato et al., 2003). A *Bgl*III and an *Nsi*I restriction sites were inserted between codons Pro419 and Leu420 of NS5A, and the coding sequence of EGFP was then inserted between these two sites. This position was previously shown to accept a GFP insertion in a sub-genomic replicon of the CON-1 strain (Moradpour et al., 2004). To insert mutations in the replicon, the NS5A coding sequence was amplified from pSGR-JFH1-NS5AGFP plasmid by PCR with two primers: (1) 5'-GCCACATGCATGCAAGCTGA-3' and (2) 5'-TCGCCCTTGCTCACAGATCT-3' and the amplified DNA was purified. Then mutations Met31Leu (M31L) and Tyr93His (Y93H) were inserted independently by PCR using two primers, 5'-GCCCCGGGCATCTTGGGGAAC-3' and 5'-TTCCCCAAGATGCCCGGGCTCCCCTT-CATC-3' for M31L, and 5'-CCCTCCGTGTGGCAATTAATAGGAAAGGT-3' and 5'-TATTAATTGCCACACGGAGGG-3' for Y93H. Plasmid pSGR-JFH1-NS5AGFP and PCR amplified DNA containing mutated sequences were digested with *Nsi*I and *Bgl*III restriction enzymes, and PCR fragment inserted by ligation into the plasmid. All constructs were verified by sequencing. These plasmids were *in vitro* transcribed before electroporation into Huh-7 cells. Cells that express wild type and mutated replicons were selected for using 500 µg/ml of geneticin during 15 days and cultured in a medium containing 250 µg/ml of geneticin.

Replication assay

Huh-7 cells stably expressing wild type or mutated replicons were seeded in 24-well plates and incubated with the different compounds for 24h, 48h and 72h. They were lysed in ice cold lysis buffer (Tris HCl 50mM, NaCl 100 mM EDTA 2 mM Triton-100 1% SDS 0.1%) on ice for 20 min. Lysates were collected and 20 µg of proteins were analyzed by Western blotting using anti-NS5A and anti-β tubulin antibodies. Peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Jackson Immunoresearch) was used for the revelation using ECL western blotting substrate (Thermo Fischer Scientific).

Wild-type, L31M and Y93H replicon cell lines were seeded in 96-well plates and incubated with boceprevir, daclatasvir or methylene chloride partition at given concentration for 72h. Cells were fixed with PFA 3% for 30 min. The cells were counted by labeling of nuclei with DAPI (0.5 µg/ml). Number of GFP-positive cells was quantified with a Zeiss Axiophot 2 microscope equipped with a 40×/1.3 numerical aperture lens. Fluorescence signals were analyzed as described previously.

Selection of dehydrojuncusol-resistant replicon and virus, and identification of resistance mutation

To obtain JFH1 dehydrojuncusol-resistant mutants, supernatants of HCV-infected cells were serially passaged with increasing concentrations (10 - 50 µg/ml) of methylene chloride partition of *J. maritimus* rhizome extract. Total RNA was extracted, non-structural protein coding region (NS2-NS5B) was amplified by reverse transcription-PCR and sequenced with specific primers. Mutations were identified by analysis of the DNA sequence compared to the initial and control passages in the absence of compound. The identified mutations were reintroduced into replicon or JFH1 plasmids by PCR mutagenesis, and the plasmids were sequenced.

Statistical Analysis

The results were presented as means ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. The statistical test used is a Mann-Whitney non-parametric test (Test t) with a confidence interval of 95%. The data were analyzed using Graph Pad Prism (Version 5.0b) by comparisons between each treated group and untreated group (DMSO control).

Results

Dehydrojuncusol present in the methylene chloride partition of *J. maritimus* rhizome extract is an inhibitor of a late step of HCV infection

We have previously screened sixteen plant extracts from eight different Tunisian extremophile plants for the presence of antiviral compounds (Sahli et al, in press). Our results demonstrated that stem, rhizome and flower extracts from *Juncus maritimus*, and stem and leaf extracts from *Silene succulenta* significantly decrease HCV infection. The strongest antiviral activity was observed for *J. maritimus* rhizome extract, a halophyte plant belonging to Juncaceae family. The methylene chloride partition of *J. maritimus* rhizome extract was the most active against HCV (Sahli et al in press). To go further in the characterization of antiviral activity and identify active compound(s) a bio-guided fractionation was performed. This partition was further fractionated in order to isolate two major phenanthrene derivatives (1 and 2). Their antiviral activity was determined. A time-addition assay was performed with the purified compounds added either only during virus inoculation or only post-inoculation or continuously during both steps. As shown in **Figure 1A**, compounds (1) and (2) were both active against HCV, compound (2) being the most active in the different conditions tested, co-addition, post-inoculation and continuously during infection. Only compound (1) significantly decreased the number of cells (**Figure 1B**) showing limited cytotoxicity. Compounds (1) significantly inhibited HCV infection at the post-inoculation step, whereas compounds (2), was active both at inoculation and post-inoculation steps. The compound (2) was the most active at the post-inoculation step with more than 95% inhibition of HCV infection. The chemical structures of the two major compounds were determined by comparison of their spectroscopic data (NMR and MS) with literature values. Compounds 1 and 2 were identified as two known phenanthrene derivatives, respectively juncusol (Della Greca et al., 1992) and dehydrojuncusol (Sarkar et al., 1988). (**Figure 2A**). The purity of these compounds was checked by UV-DAD (juncusol: 99.5%; dehydrojuncusol: 98.8%). As compound (2), dehydrojuncusol, was the most active, we decided to further analyze its antiviral activity.

The antiviral effect of dehydrojuncusol was further examined by measuring HCV infectious titers. A dose-dependent decrease of the infectious titer was observed, with a 1-log₁₀ decrease at 2.2 μM confirming its high anti-HCV capacity (**Figure 2B**). Time-addition assay of dehydrojuncusol was performed and confirmed that this compound was significantly more active during a post-inoculation step (**Figure 2C**). No effect of dehydrojuncusol was observed when cells were preincubated with the compound 2h before inoculation and when it was co-added with the virus. To measure the EC₅₀, a dose-response inhibition experiment was then performed with Huh-7 cells incubated with increasing concentrations of dehydrojuncusol at

different steps of the infection, either during inoculation, or post-inoculation or continuously (**Figure 2D**). The results show that the EC₅₀ of dehydrojuncusol was 1.35 μM when added continuously, 8.21 μM when added during inoculation, and 1.53 μM when added post-inoculation, confirming the major effect of the molecule at the post-inoculation step. The toxicity of the compound on Huh-7 cells was also tested in parallel at different time points, 24h, 48h, and 72h. The results showed that the cytotoxic concentration (CC₅₀) of dehydrojuncusol was approximately 75.6 μM (**Figure 2E**), much higher than the active dose, yielding a selective index of 56.

Taken together, these results showed that dehydrojuncusol inhibited predominantly a late step of HCV infectious cycle, most likely the replication, and, to a lesser extent, an early step of infection, potentially the entry step.

Dehydrojuncusol inhibits replication of HCV and not entry

As shown above, dehydrojuncusol seems to inhibit both early and late steps of HCV infection. To determine if the molecule is able to inhibit HCV entry, HCVpp expressing E1E2 envelope glycoprotein at their surface were produced and used to infect Huh-7 cells in the presence of dehydrojuncusol at different concentrations. Delphinidin at 50 μM , an inhibitor of HCV entry, was added as a control. A strong inhibition of HCVpp infection was observed with delphinidin. In contrast no effect of dehydrojuncusol on HCVpp entry was observed even at concentration up to 94.7 μM (**Figure 3A**). This result showed that dehydrojuncusol was not an inhibitor of HCV entry.

To test the activity of dehydrojuncusol on replication independently of entry, Huh-7 cells stably expressing a HCV-replicon were used. This replicon, SGR-JFH1-NS5AGFP, expresses a GFP-tagged NS5A. Due to some difficulties to purify enough dehydrojuncusol in sufficient quantity from *J. maritimus* extract to perform all the tests, the methylene chloride partition was used. The replicon cells were incubated with methylene chloride partition and lysed at different time points. Boceprevir, an inhibitor of NS3/4A protease and daclatasvir, an inhibitor of NS5A protein, were used as controls. The activity of the molecules against HCV replication was determined by quantifying the expression of NS5A-GFP protein by Western blots. As shown in **Figure 3B**, the expression of NS5A-GFP was decreased in replicon cells incubated with boceprevir, daclatasvir and methylene chloride partition of *J. maritimus*, showing an inhibitory effect of dehydrojuncusol on HCV replication. Inhibition was observed at all time points, 24h, 48h and 72h of treatment, showing a rapid antiviral activity of

methylene chloride partition. Taken together, these results showed that methylene chloride partition of *J. maritimus* and most likely dehydrojuncusol were inhibitors of HCV replication.

Dehydrojuncusol has no effect on BVDV and YFV

We tested the antiviral effect of the methylene chloride partition of *J. maritimus*, containing dehydrojuncusol, against two other members of the *Flaviviridae* family, YFV and BVDV, and, as shown in **Figure 3C**, after treatment with 10 µg/ml of *J. maritimus* methylene chloride partition, a concentration that significantly inhibit HCV infection, no significant decrease in infectivity was observed neither for YFV nor for BVDV. This result shows that dehydrojuncusol is not active against all the members of the *Flaviviridae* family. This suggested that it could target HCV protein(s) directly or a cellular factor specifically involved in HCV replication.

Dehydrojuncusol inhibits HCV infection in PHH

Primary human hepatocytes (PHH) are the unique human pre-clinical model available to test the activity of an inhibitor on HCV infection. A dose-response experiment was performed in PHH inoculated with JFH-1. PHH were infected during 72h and supernatants containing HCVpc were used to infect Huh-7 cells to measure infectious titers. As shown in **figure 4A**, a dose-dependent decrease of HCV titer was observed with dehydrojuncusol showing that the molecule is able to inhibit HCV infection in PHH. Very interestingly, the EC₅₀ of dehydrojuncusol in PHH is 1.14 µM, similar to the EC₅₀ calculated in Huh-7 cells, 1.35 µM. The toxicity of the molecule in PHH was measured and the results presented in **figure 4B** showed that dehydrojuncusol was not toxic in PHH at active concentrations.

Dehydrojuncusol inhibits replication of HCV mutants resistant to NS5A inhibitors

Some patients treated with the newly approved DAA molecules targeting NS5A or NS5B become resistant to the therapy due to the apparition of HCV resistant mutants. Once present in patients, these resistant mutants are very difficult to eliminate, particularly for the resistant mutants appearing after treatment with anti-NS5A molecules, like daclatasvir, ledipasvir or ombitasvir. To determine if dehydrojuncusol could be active against HCV resistant mutants, we generated mutated replicon harboring point mutation L31M or Y93H. These two mutations conferred resistance to NS5A targeting drugs, including daclatasvir, ledipasvir and ombitasvir, in patients infected with HCV of different genotypes, and are often associated with treatment failure (Pawlotsky, 2016; Sarrazin, 2016). Huh-7 cells harboring mutant

replicons were incubated with methylene chloride partition of *J. maritimus*, containing dehydrojuncusol, and lysed after 72h of treatment. Daclatasvir and boceprevir, were used as controls. As shown in **Figure 5A**, in the L31M and Y93H replicon cell lysates, the NS5A-GFP protein is detected after 72h of treatment with daclatasvir showing that the replicon are resistant to daclatasvir at 0.5 nM. When treated with boceprevir, NS5A-GFP is not detected showing that the mutants are still sensitive to boceprevir, as expected. In cells expressing mutated replicon treated with methylene chloride partition at 10 µg/ml, NS5A-GFP was not detected in the L31M mutant showing that dehydrojuncusol is able to inhibit resistant mutant replication. However, it was still detectable at lower level in the Y93H daclatasvir resistant mutant, showing that this mutant is partially resistant to dehydrojuncusol. To quantify this activity, a dose-response experiment was performed on replicon cells treated with either daclatasvir or dehydrojuncusol and the number of cells expressing NS5A-GFP after 72h of treatment was quantified. As shown in **Figure 5C**, the L31M mutant was very sensitive to the dehydrojuncusol with an EC₅₀ of 0.22 µM similar to wild-type 0.40 µM. As expected, the Y93H daclatasvir-resistant was less sensitive to dehydrojuncusol than the wild-type replicon, with an EC₅₀ of 3.62 µM. However, the EC₅₀ fold change was only of 9, much lower than the one observed with daclatasvir as observed in **Figure 5B** and which was calculated to be over 100 (Fridell et al., 2011).

Mutants resistant to dehydrojuncusol

In order to further investigate the mechanism of action of dehydrojuncusol, we selected partially resistant mutants to the methylene chloride partition of *J. maritimus* rhizome extract after 8 passages of JFH1 virus in Huh-7 cells in increasing concentration of compounds. We searched for mutations in HCV non-structural genes (NS2 to NS5B) and identified a double mutant in NS5A, T24S-L31M. These mutations were inserted in JFH1 by reverse genetic and the resistance of the viruses to dehydrojuncusol investigated in a dose-response study. Interestingly, this double mutation was already identified in ombistasvir resistant replicon of genotype 2a T24A(L31), as well as the single mutation T24A (Krishnan et al., 2015). Three mutants were obtained, JFH1 T24S, L31M and T24S-L31M. We also tested the daclatasvir resistant mutant Y93H as a control. As shown in Figure 6A, as expected, all the mutants were resistant to daclatasvir. However, double mutations T24S-L31M seemed to confer a moderate resistance to dehydrojuncusol, similar to the one observed with JFH1 Y93H. The mutants L31M is as sensitive as WT JFH1 to dehydrojuncusol, confirming the results obtained with the replicon (Figure 5C), as well as the T24S single mutant (data not shown). Taken together,

these results seemed to demonstrate that (i) NS5A is the target of dehydrojuncusol with three mutations in NS5A that conferred partial resistance to this molecule (T24S-L31M and Y93H), and (ii) all the HCV mutants resistant to daclatasvir could be inhibited by dehydrojuncusol.

Discussion

Plants are known to be an important source of numerous bioactive compounds (Newman and Cragg, 2012). Here, we highlighted the strong inhibition HCV replication in HCVcc system of a bioactive molecule, dehydrojuncusol, isolated from a *J. maritimus* rhizomes extract. More interestingly, we also showed that this natural product strongly inhibited the virus in PHH, which are the only human preclinical model for hepatitis C. Many different drugs are now available to cure hepatitis C, but in some patients, apparition of viral variants resistant to the treatment makes them difficult to cure, especially for NS5A resistant mutants. Unfortunately, the sets of marketed molecules available are not efficient to cure such resistant viruses (Pawlotsky, 2016). In this work, we demonstrate that dehydrojuncusol has the capacity to inhibit NS5A resistant mutants appearing in patients treated with anti-NS5A inhibitors, L31M and Y93H, which are two major resistant variants appearing after treatment with NS5A inhibitors daclatasvir, ledipasvir and ombitasvir (Pawlotsky, 2016; Sarrazin, 2016). These mutants are often associated with treatment failure.

We tried to identify the viral target of dehydrojuncusol, and, quite surprisingly, it seemed to be NS5A as 3 mutations (T24S-L31M, Y93H) that conferred partial resistance to this compound were identified in this protein. The mutations T24S-L31M should be linked because they did not confer resistance to dehydrojuncusol when present individually in JFH1. Unfortunately, in a mechanistic point of view, the resistance was partial and the target of dehydrojuncusol was not clearly identified even if all the mutations were located in the domain I of NS5A. It could have been not easy to obtain mutants with high resistance to dehydrojuncusol because we used the methylene chloride partition of *J. maritimus* rhizome extracts to obtain the mutants, due to the difficulties to purify high amount of dehydrojuncusol needed for this experiment. This partition contained different compounds that may also have been active against HCV. As shown in Figure 1A, juncusol (compound 1) was also active but with an uncharacterized mechanism of action, and other minor compounds may also possess an anti-HCV activity (data not shown). The complexity of the composition of the partition may have rendered the identification of dehydrojuncusol resistant

mutants more difficult. However, the lack of complete resistance of the different mutants was also encouraging in a therapeutic point of view, because it meant that dehydrojuncusol could be a molecule used for patients with treatment failure. Therefore, dehydrojuncusol or molecules derived from dehydrojuncusol might be of great interest in the future to cure patients with resistant variants and treatment failure. Furthermore, the present therapy is suboptimal for patients infected with HCV genotype 3a. It will be interesting to test the efficacy of dehydrojuncusol against HCVcc of genotype 3a.

Unexpectedly for a replication inhibitor, dehydrojuncusol also inhibits HCV infection when it is added to the cells during virus contact and removed later on (**Figure 2C** and **2D**). This ability to inhibit an early step of HCVcc infection is probably not due an inhibition of HCV entry as this molecule is not active on HCVpp (**Figure 3A**). It is likely that this effect results from dehydrojuncusol molecules that enter cells during viral inoculation, remain trapped inside the cells and are able to inhibit HCV replication afterwards.

The EC_{50} of dehydrojuncusol is near 1 μ M, both in HCVcc system and in PHH, a concentration relatively low for a natural product. This molecule might serve of a starting point for a study of structure activity relationships and drug design to increase its antiviral capacity and reduce its EC_{50} . It is rare that a compound is as active in Huh-7 as in PHH. Its toxicity in Huh-7 cells is relatively low with a CC_{50} of approximately 75 μ M, leading to a selective index of 56. Similarly, no toxicity was observed in PHH even at high concentration.

Unfortunately, little is known about the bioavailability of this compound in animal models or in humans. More generally, few/no pharmacokinetics studies *in-vivo* or in humans of phenanthrene derivatives were reported. Natural phenanthrenes are an uncommon class of aromatic metabolites which in a biosynthetic point of view can originate from stilbene precursors and more rarely from diterpenoid precursors. These compounds are biosynthesized by a limited number of botanical families. Orchidaceae and Juncaceae are the main botanical families known to produce this kind of natural products (El-Shamy et al., 2015; Kovács et al., 2008). 9,10-dihydrophenanthrenes and phenanthrenes showed a large panel of biological activities, including among others cytotoxicity, antimicrobial, spasmolytic and anti-inflammatory activities. However, this potential is not investigated sufficiently and not really exploited (Kovács et al., 2008). Concerning the antiviral activities of phenanthrene derivatives, a limited number of studies exist in the literature. Some phenanthrene derivatives isolated from *Tamus communis* (Dioscoreaceae) showed antiviral activity against two RNA enveloped virus: vesicular stomatitis virus (VSV) and human rhinovirus serotype 1B (HRV 1B) (Aquino et al., 1991). So far, no antiviral activity was highlighted for dehydrojuncusol.

Only a moderate anti-inflammatory activity has been shown for this natural product (Behery et al., 2007).

J. maritimus is a perennial plant which thrives in particular on saline soils. In the framework of our study, this halophyte plant was collected in Tunisia, but *J. maritimus* is present worldwide in the coast line of many different areas, including several European countries such as France. Few traditional uses are mentioned for this plant in Tunisia, with the exception of its use in making baskets and curtains. Its usage as an antiviral agent is a new opportunity for economic valorization of this plant. One of the disadvantages of our study is that the part of plant used is not renewable (rhizomes), so the chemical synthesis of dehydrojuncusol or a more active derivative could be an issue. It would be also interesting to search for dehydrojuncusol in other *Juncus* species and especially in parts of plant renewable, such as aerial parts. Interestingly, this phenanthrene derivative has been previously isolated from the aerial parts of *Juncus* species, such as *J. acutus* (Della Greca et al., 2002) and *J. effusus* (Wang et al., 2012), increasing its potential for its use in low income countries.

In conclusion, we showed that dehydrojuncusol, an active compound present in *J. maritimus* rhizomes, was able to inhibit HCV replication in a dose dependent manner. Although it probably targeted NS5A, it inhibited the replication of resistant viruses appearing in patients treated with anti-NS5A inhibitors and responsible for treatment failure. This molecule should be further investigated for being able to be used in patients of developing countries or in patients resistant to therapy for whom re-treatments are envisaged.

Acknowledgments

References

- Abreu, A.C., McBain, A.J., Simões, M., 2012. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1007–1021.
- Aquino, R., Conti, C., De Simone, F., Orsi, N., Pizza, C., Stein, M.L., 1991. Antiviral activity of constituents of *Tamus communis*. *J. Chemother. Florence Italy* 3, 305–309.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., 2010. Recent Advances in Hepatitis C Virus Cell Entry. *Viruses* 2, 692–709.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., Cosset, F.-L., 2003. Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *J. Exp. Med.* 197, 633–642.
- Behery, F.A.A., Naeem, Z.E.M., Maatooq, G.T., Amer, M.M.A., Wen, Z.-H., Sheu, J.-H., Ahmed, A.F., 2007. Phenanthrenoids from *Juncus acutus* L., new natural lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 55, 1264–1266.
- Calland, N., Dubuisson, J., Rouillé, Y., Séron, K., 2012. Hepatitis C virus and natural compounds: a new antiviral approach? *Viruses* 4, 2197–2217.

- Calland, N., Sahuc, M.-E., Belouzard, S., Pène, V., Bonnafous, P., Mesalam, A.A., Deloison, G., Descamps, V., Sahpaz, S., Wychowski, C., Lambert, O., Brodin, P., Duverlie, G., Meuleman, P., Rosenberg, A.R., Dubuisson, J., Rouillé, Y., Séron, K., 2015. Polyphenols Inhibit Hepatitis C Virus Entry by a New Mechanism of Action. *J. Virol.*
- Delgrange, D., Pillez, A., Castelain, S., Cocquerel, L., Rouillé, Y., Dubuisson, J., Wakita, T., Duverlie, G., Wychowski, C., 2007. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 88, 2495–2503.
- Della Greca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Lavorogna, M., Monaco, P., Previtiera, L., Zarrelli, A., 2002. Phenanthrenoids from the wetland *Juncus acutus*. *Phytochemistry* 60, 633–638.
- Della Greca, M., Fiorentino, A., Mangoni, L., Molinaro, A., Monaco, P., Previtiera, L., 1992. 9, 10-dihydrophenanthrene metabolites from *Juncus effusus* L. *Tetrahedron Lett.* 33, 5257–5260.
- Dubuisson, J., Hsu, H.H., Cheung, R.C., Greenberg, H.B., Russell, D.G., Rice, C.M., 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J. Virol.* 68, 6147–6160.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., Bienz, K., 2002. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *J. Virol.* 76, 5974–5984.
- El-Shamy, A.I., Abdel-Razek, A.F., Nassar, M.I., 2015. Phytochemical review of *Juncus* L. genus (Fam. Juncaceae). *Arab. J. Chem.* 8, 614–623.
- Fridell, R.A., Qiu, D., Valera, L., Wang, C., Rose, R.E., Gao, M., 2011. Distinct Functions of NS5A in Hepatitis C Virus RNA Replication Uncovered by Studies with the NS5A Inhibitor BMS-790052. *J. Virol.* 85, 7312–7320.
- Gibbons, S., 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat. Prod. Rep.* 21, 263–277.
- Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J., Rouillé, Y., 2010. Identification of GBF1 as a Cellular Factor Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Virol.* 84, 773–787.
- Graham, C.S., Swan, T., 2015. A path to eradication of hepatitis C in low- and middle-income countries. *Antiviral Res.* 119, 89–96.
- Hajarizadeh, B., Grebely, J., Dore, G.J., 2013. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 553–562.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., Wakita, T., 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125, 1808–1817.
- Kovács, A., Vasas, A., Hohmann, J., 2008. Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry* 69, 1084–1110.
- Krishnan, P., Beyer, J., Mistry, N., Koev, G., Reisch, T., DeGoey, D., Kati, W., Campbell, A., Williams, L., Xie, W., Setze, C., Molla, A., Collins, C., Pilot-Matias, T., 2015. In Vitro and In Vivo Antiviral Activity and Resistance Profile of Ombitasvir, an Inhibitor of Hepatitis C Virus NS5A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 979–987.
- Ksouri, R., 2012. Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Crit Rev Biotechnol* 32, 289–326.
- Lavanchy, D., 2011. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 107–115.
- Lecot, S., Belouzard, S., Dubuisson, J., Rouillé, Y., 2005. Bovine Viral Diarrhea Virus Entry Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* 79, 10826–10829.
- Levrero, M., 2006. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 25, 3834–3847.

- Liang, T.J., Ghany, M.G., 2013. Current and Future Therapies for Hepatitis C Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* 368, 1907–1917.
- Lindenbach, B.D., Thiel, H.-J., Rice, C.M., 2007. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology 5th Edition*. David M. Knipe, Peter M. Howley, pp. 1101–1152.
- Messina, J.P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G.S., Pybus, O.G., Barnes, E., 2015. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 61, 77–87.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., Shimotohno, K., 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* 9, 1089–1097.
- Moradpour, D., Evans, M.J., Gosert, R., Yuan, Z., Blum, H.E., Goff, S.P., Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2004. Insertion of Green Fluorescent Protein into Nonstructural Protein 5A Allows Direct Visualization of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. *J. Virol.* 78, 7400–7409.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J., 1982. Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer Res.* 42, 3858–3863.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311–335.
- Pawlotsky, J., 2014. New Hepatitis C Therapies: The Toolbox, Strategies, and Challenges. *Gastroenterology* 146, 1176–1192.
- Pawlotsky, J.-M., 2016. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology* 151, 70–86.
- Pène, V., Hernandez, C., Vauloup-Fellous, C., Garaud-Aunis, J., Rosenberg, A.R., 2009. Sequential processing of hepatitis C virus core protein by host cell signal peptidase and signal peptide peptidase: a reassessment. *J. Viral Hepat.* 16, 705–715.
- Podevin, P., Carpentier, A., Pène, V., Aoudjehane, L., Carrière, M., Zaïdi, S., Hernandez, C., Calle, V., Méritet, J., Scatton, O., Dreux, M., Cosset, F., Wakita, T., Bartenschlager, R., Demignot, S., Conti, F., Rosenberg, A.R., Calmus, Y., 2010. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Primary Cultures of Human Adult Hepatocytes. *Gastroenterology* 139, 1355–1364.e6.
- Polyak, S.J., Oberlies, N.H., Pécheur, E.-I., Dahari, H., Ferenci, P., Pawlotsky, J.-M., 2013. Silymarin for hepatitis C virus infection. *Antivir. Ther.* 18, 141–147.
- Rouillé, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A.H., Maertens, G., Wakita, T., Wychowski, C., Dubuisson, J., 2006. Subcellular Localization of Hepatitis C Virus Structural Proteins in a Cell Culture System That Efficiently Replicates the Virus. *J. Virol.* 80, 2832–2841.
- Sarkar, H., Zerezhgi, M., Bhattacharyya, J., 1988. Dehydrojuncusol, a constituent of the roots of *Juncus roemerianus*. *Phytochemistry* 27, 3006–3008.
- Sarrazin, C., 2016. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J. Hepatol.* 64, 486–504.
- Tarr, A.W., Khera, T., Hueging, K., Sheldon, J., Steinmann, E., Pietschmann, T., Brown, R.J.P., 2015. Genetic Diversity Underlying the Envelope Glycoproteins of Hepatitis C Virus: Structural and Functional Consequences and the Implications for Vaccine Design. *Viruses* 7, 3995–4046.
- Wang, Y.-G., Wang, Y.-L., Zhai, H.-F., Liao, Y.-J., Zhang, B., Huang, J.-M., 2012. Phenanthrenes from *Juncus effusus* with anxiolytic and sedative activities. *Nat. Prod. Res.* 26, 1234–1239.
- Wright, C.W., 2010. Recent developments in research on terrestrial plants used for the

treatment of malaria. Nat. Prod. Rep. 27, 961–968.

Legend to figures

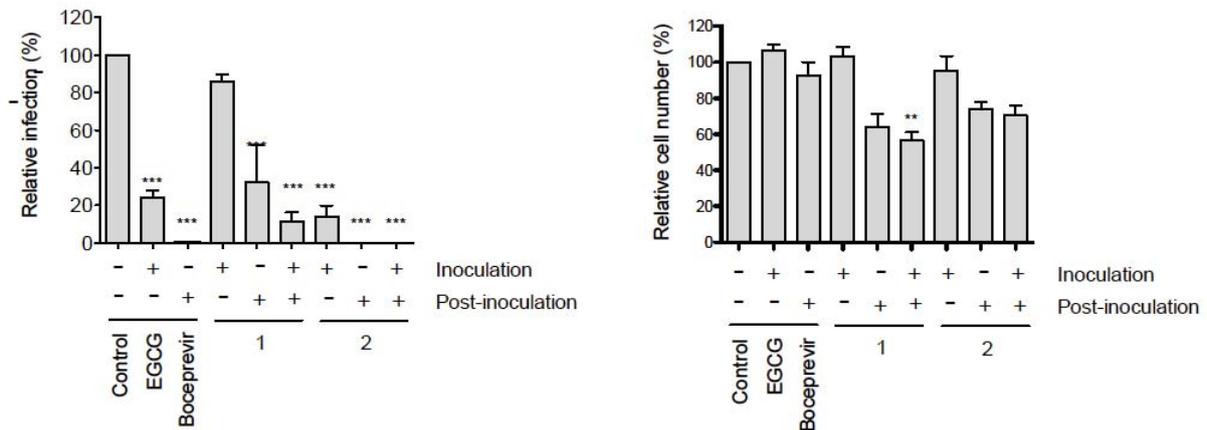


Figure 1. Screening of compounds isolated from *J. maritimus* rhizome extract for anti-HCV activity. Huh-7 cells were inoculated with HCVcc for 2h either in the presence (+) or not (-) of isolated compounds at 10 µg/ml, or 50 µM EGCG, or 1 µM boceprevir. DMSO was used as a control. Cells were further incubated in medium containing (+) or not (-) the compounds for 28h and cells were fixed. **(A)** Infectivity was measured by the use of immunofluorescence labeling of HCV E1 envelope protein, and by calculating the number of infected cells. Data are expressed as a percentage of values measured with DMSO. Data are means of values obtained in 3 independent experiments performed in triplicate. Error bars represent standard error of the means (SEM). **(B)** Nuclei were stained with DAPI to quantify the number of cells.

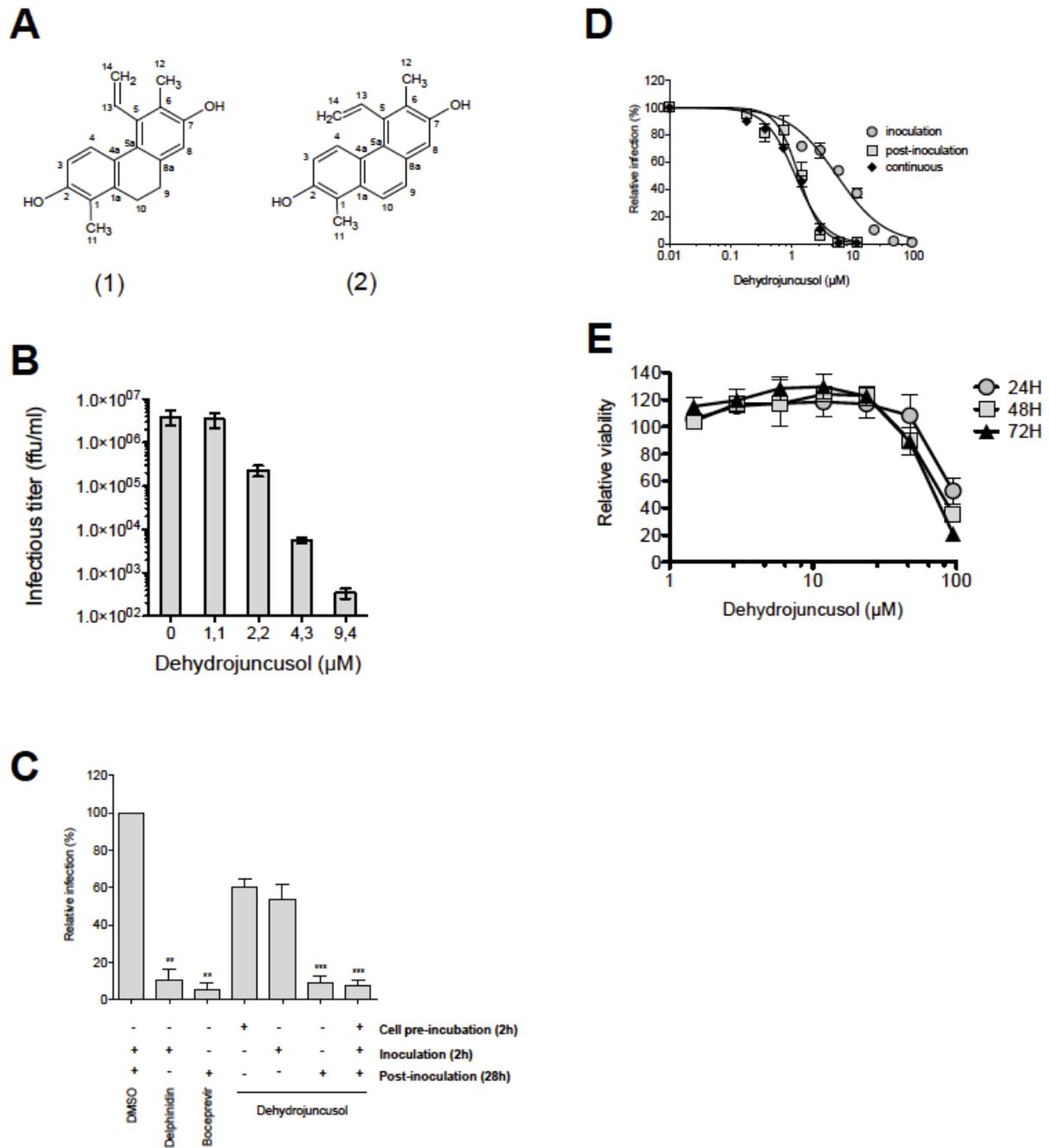


Figure 2. Dehydrojuncusol inhibits HCV infection in a dose dependent manner. (A) Chemical structure of juncusol (1) and dehydrojuncusol (2). **(B)** Huh-7 cells were infected with HCVcc in the presence of dehydrojuncusol at different concentrations. 48h post-infection, supernatants were collected and infectious titers measured serial dilutions of the supernatants and reinfection of naive Huh-7 cells. Ffu/ml were quantified after 48h **(C)** Time-addition assay. Dehydrojuncusol at 3.8 μM, delphinidin at 50 μM or boceprevir at 1 μM were added at different time points as indicated (+). Cells were either pre-incubated with the compounds for 2h, or compounds added during HCVcc inoculation (2h) or post inoculation

(28h). Infectivity was measured by the use of immunofluorescence labeling of HCV E1 envelope protein, and by calculating the number of infected cells. **(D)** Huh-7 cells were inoculated with HCVcc in the presence of increasing concentration of dehydrojuncusol either for 2h inoculation, 28h post-inoculation or continuously. Infectivity was measured by the use of immunofluorescence labeling of HCV E1 envelope protein, and by calculating the number of infected cells. **(E)** Huh-7 cells were cultured in the presence of given concentrations of dehydrojuncusol. The viability was monitored using an MTS-based viability assay after 24h, 48h and 72h. Data are expressed as a ratio to control i.e. the condition without extracts. Data are means of values obtained in 3 independent experiments performed in triplicate. Error bars represent SEM.

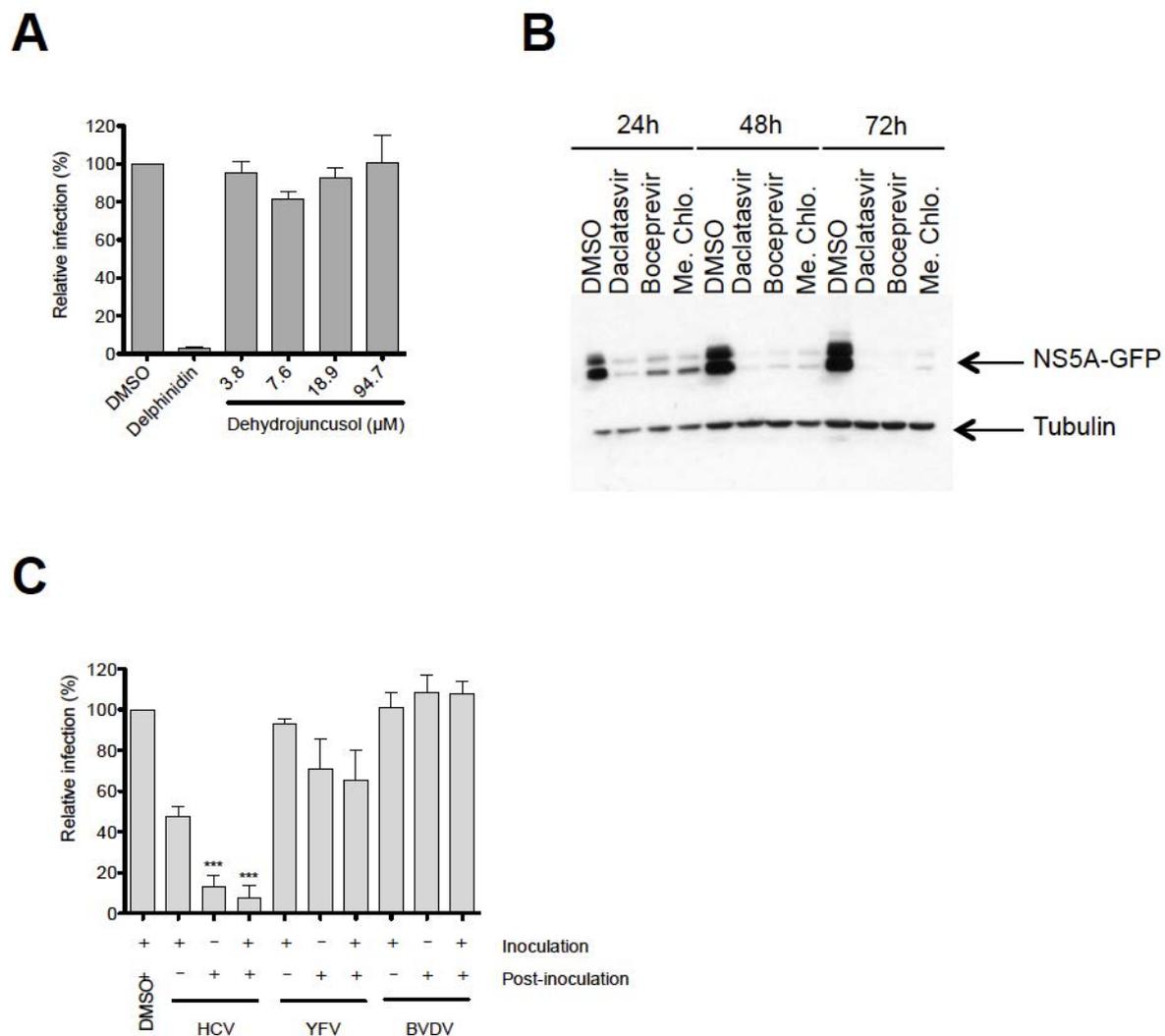


Figure 3. Dehydrojuncusol inhibits HCV replication. (A) HCVpp were used to inoculate Huh-7 cells in the presence of dehydrojuncusol at indicated concentrations. Delphinidin at 50 μM was used as a control. 48h post-infection, cells were lysed and luciferase activity

quantified. Data are expressed as a ratio to the DMSO control (100%). **(B)** Established replicon SGR-JFH1-NS5AGFP Huh-7 cells were incubated for the indicated time with either 0.5 nM daclatasvir, 1 μ M boceprevir, or 10 μ g/ml of methylene chloride partition of *J. maritimus*. DMSO was used as a control. Cells were lysed and lysates subjected to SDS-PAGE followed by Western blot revelation of GFP and tubulin. **(C)** Huh-7 cells were inoculated with HCVcc, or YFV and MDBK cells with BVDV in the presence (+) or absence (-) of 10 μ g/ml of methylene chloride partition of *J. maritimus*. Inoculum was removed and replaced with medium with (+) or without (-) 10 μ g/ml of methylene chloride partition of *J. maritimus*. Cells were fixed and infection detected by immunofluorescence labeling of viral proteins. Data are means of values obtained in 3 independent experiments performed in triplicate. Error bars represent SEM.

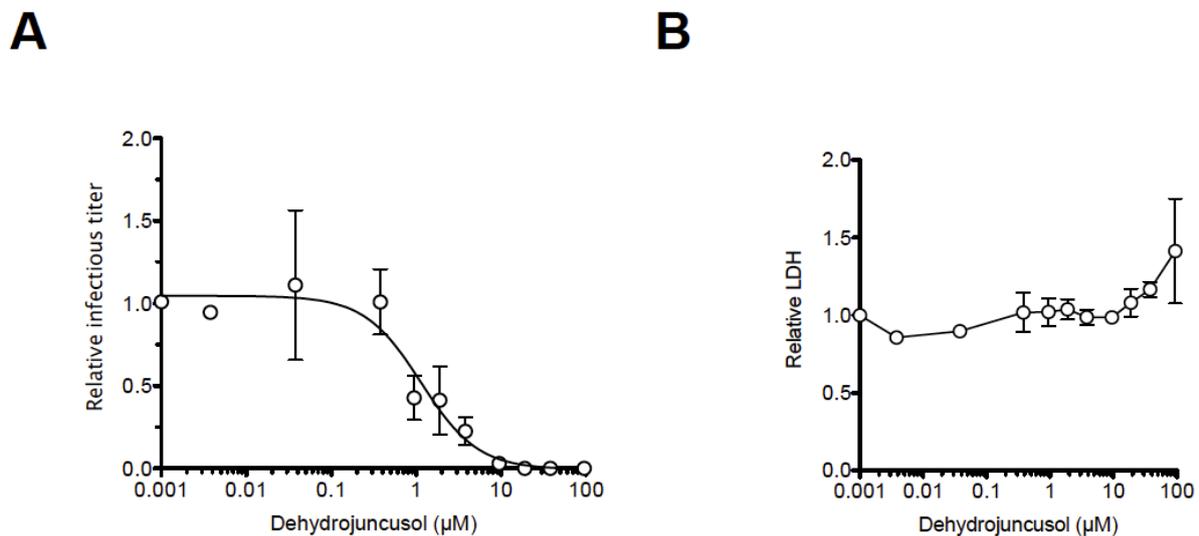


Figure 4. Dehydrojuncusol inhibits HCV infection in PHH. PHH were inoculated with HCVcc in the presence of the indicated concentrations of dehydrojuncusol. (A) Infectious titers in culture supernatants were expressed as ratio to carrier control. (B) Cytotoxicity was expressed as a ratio to carrier control. Data are means (\pm SEM) of 3 independent experiments performed in triplicate.

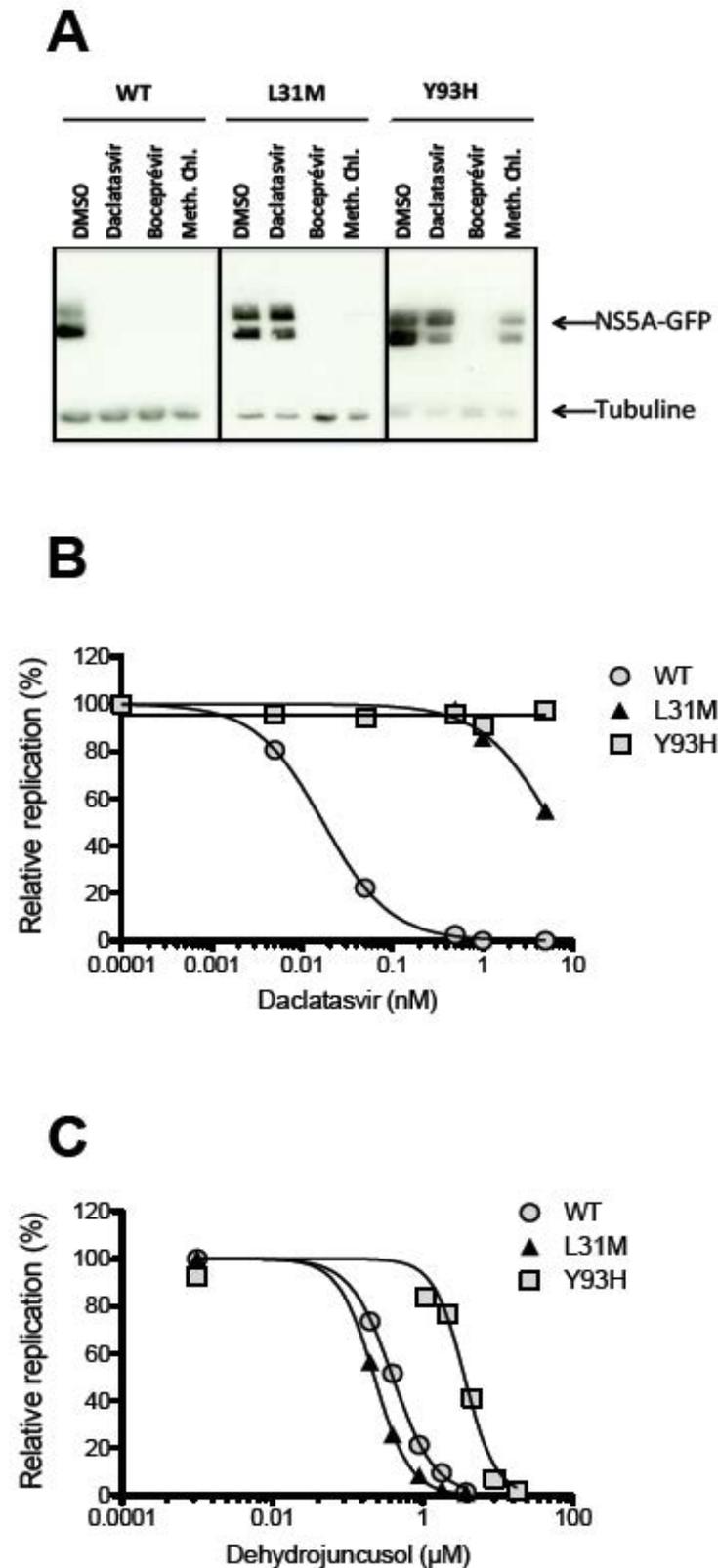


Figure 5. Dehydrojuncusol inhibits daclatasvir NS5A resistant mutants. (A) Huh-7 cells stably expressing subgenomic replicon SGR-JFH1-NS5A wild-type or harboring L31M or Y93H mutation in NS5A conferring resistance to daclatasvir were incubated for 72h either with 0.5 nM daclatasvir, 1 μ M boceprevir, or 10 μ g/ml of methylene chloride partition of *J.*

maritimus. DMSO was used as a control. Cells were lysed and lysates subjected to SDS-PAGE followed by Western blot revelation of GFP and tubulin. **(B)(C)** Huh-7 cells stably expressing subgenomic replicon SGR-JFH1-NS5A wild-type or harboring L31M or Y93H mutation in NS5A conferring resistance to daclatasvir were incubated for 72h with increasing concentrations of daclatasvir **(B)** or dehydrojuncusol **(C)**. Cells were fixed and GFP positive cells, representing replication, quantified. Replication of subgenomic replicon was expressed as a ratio to carrier control DMSO. Data are means of values obtained in 3 independent experiments performed in triplicate. Error bars represent SEM.

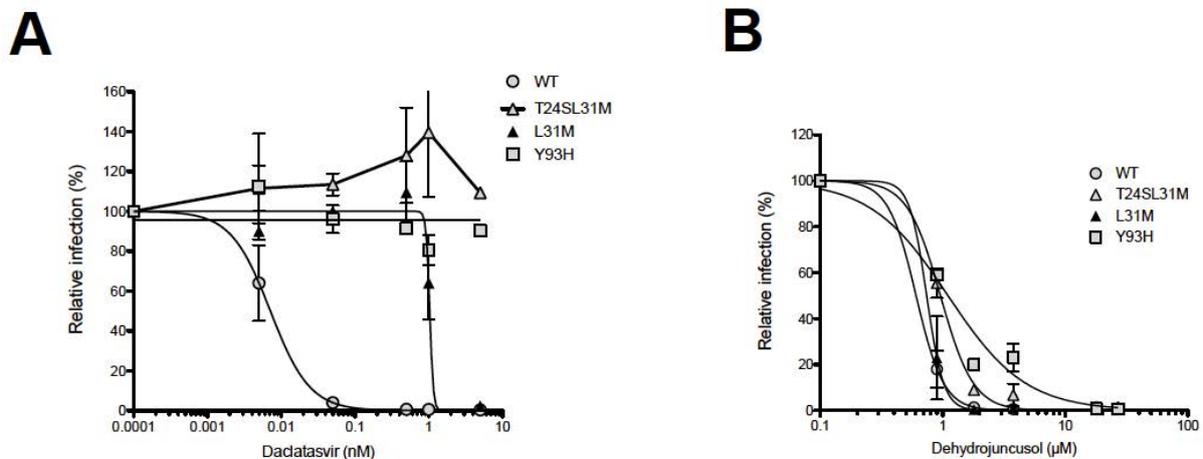


Figure 6. Double mutations T24S-L31M and single mutation Y93H confer partial resistance to dehydrojuncusol. Huh-7 cells were inoculated with wild-type (WT) HCVcc or harboring different mutations, T24S-L31M, L31M or Y93H in the presence of **(A)** daclatasvir or **(B)** dehydrojuncusol at different concentrations for 2h. Inoculum was removed and replaced with medium containing the different drugs at the same concentration for 28h. Cells were fixed and infection detected by immunofluorescence labeling of E1 envelope protein. Data are means of values obtained in 3 independent experiments performed in triplicate. Error bars represent SEM.

Partie 3 :

Identification de composé
actif contre le VHC à partir
d'extraits bruts de plantes
Ivoriennes

Introduction

Une approche ethnopharmacologique a été mise en place par un étudiant en thèse à l'université Nagui Abrogoua (Abidjan, Côte d'Ivoire), Moussa Bamba. L'objectif de ce travail est d'identifier les composés actifs provenant de plantes utilisées en médecine traditionnelle ivoirienne. Cet étudiant s'est intéressé aux plantes utilisées contre le « paludisme jaune », faisant référence en médecine traditionnelle aux ictères qui sont l'un des symptômes de l'hépatite C. Après avoir interrogé, en Côte d'Ivoire, des tradipraticiens, Moussa Bamba est venu en stage dans le laboratoire de pharmacognosie de la faculté de Pharmacie de Lille avec une quinzaine de plante utilisée en médecine traditionnelle qu'il avait récolté (Tableau 1).

	Espèces	Organes utilisés	Familles
A	<i>Combretum collinum</i>	Feuilles	Combretaceae
B	<i>Carapa procera</i>	Feuilles	Meliaceae
C	<i>Pericopsis laxiflora</i>	Feuilles	Fabaceae
D	<i>Paullinia pinnata</i>	Feuilles	Sapindaceae
E	<i>Pseudarthria hookeri</i>	Feuilles	Fabaceae
F	<i>Sarcocephalus latifolius</i>	Feuilles	Rubiaceae
G	<i>Terminalia glauscesens</i>	Feuilles	Combretaceae
H	<i>Terminalia macroptera</i>	Feuilles	Combretaceae
I	<i>Uapaca togoensis</i>	Feuilles	Euphorbiaceae
J	<i>Alstonia boonei</i>	Ecorces	Apocynaceae
K	<i>Anogeissus leocarpum</i>	Racines	Combretaceae
L	<i>Mallotus oppositifolius</i>	Feuilles	Euphorbiaceae
M	<i>Momordica charantia</i>	Lianes entières	Cucurbitaceae
N	<i>Parquetina nigrescens</i>	Feuilles	Periplocaceae
O	<i>Rauwolfia vomitoria</i>	Feuilles/écorces	Apocynaceae
P	<i>Trichilia monadelpha</i>	Ecorces	Meliaceae

Tableau 1: Plantes utilisées en médecine traditionnelle Ivoirienne issues de l'enquête ethnobotanique testées contre le VHC. Les extraits bruts de l'écorce (OE) et les feuilles (OF) de la plante annoté O ont été testés séparément.

Un fractionnement successif bio-guidé (Figure 1), en collaboration entre le laboratoire de pharmacognosie et notre laboratoire, a ensuite été effectué afin d'identifier et d'orienter les fractionnements uniquement vers les échantillons ayant une action inhibitrice contre le VHC.

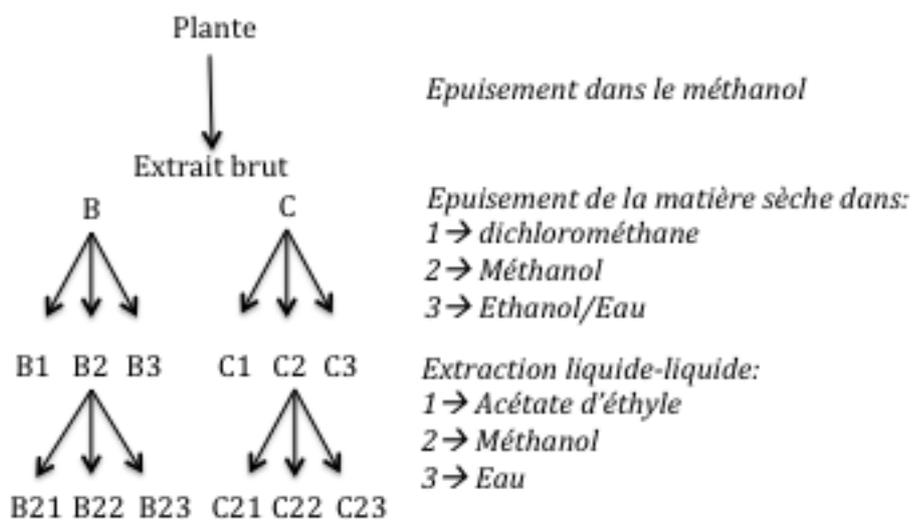


Figure 1: Méthode de fractionnement bio-guidé des extraits bruts de plantes Ivoiriennes

Méthodes

VHCcc

La souche virale JFH1 du génotype 2a a été utilisée au cours des expérimentations (Delgrange et al., 2007 ; Goueslain et al., 2010). Pour les tests d'infections les cellules Huh-7 ont été utilisées. 6000 cellules/puits ont été placées dans des plaques 96 puits avec une multiplicité d'infection (MOI) de 0.8 durant deux heures d'infection à 37°C avec le VHCcc puis l'inoculum est remplacé par du milieu complet de culture cellulaire pendant 28h à 37°C. Les extraits de plantes sont incubés soit pendant les 2h d'inoculation en présence du VHCcc, soit pendant les 28h post-inoculation ou soit durant 30h en continu (2h d'inoculation additionné au 28h post inoculation). Les cellules sont ensuite été fixées avec du méthanol froid.

Immunofluorescence

Les noyaux cellulaires sont marqués avec 1µg/ml de DAPI et les cellules infectées par le VHCcc sont détectées avec l'anticorps A4 (produit au laboratoire) marquant la glycoprotéine d'enveloppe E1 du VHCcc. La quantification du nombre de cellule totale et des cellules infectées est automatisée par un microscope confocal IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare Life Sciences) utilisant l'objectif 20X avec les paramètres d'expositions 405/450 nm et 561/610 nm. 6 champs par puits sont pris, et chaque champ est analysé avec le logiciel Columbus (Perkin Elmer). Les noyaux et la région cytoplasmique sont segmentés en se basant sur le DAPI. Les objets avec une taille spécifique et prédéfinie sont quantifiés correspondant au nombre de cellules totales. Le ratio entre le nombre de cellules totales et le nombre de cellules infectés correspond au pourcentage d'infection. La quantité de cellules et le MOI sont calculés afin d'obtenir au maximum 40% de cellules infectées au bout de 30h. Les données sont normalisées à 100 % avec le contrôle DMSO

Résultats

Dans un premier temps des extraits bruts de ces différentes plantes ont été obtenus par épuisement avec le méthanol. Un premier test contre le VHC a été réalisé (Figure 2) avec les 16 extraits bruts de plantes. Les extraits bruts de *Carapa procera* (B) et *Pericopsis laxiflora* (C) se sont avérés être les plus actifs contre le VHC et inhibant spécifiquement l'étape d'entrée virale.

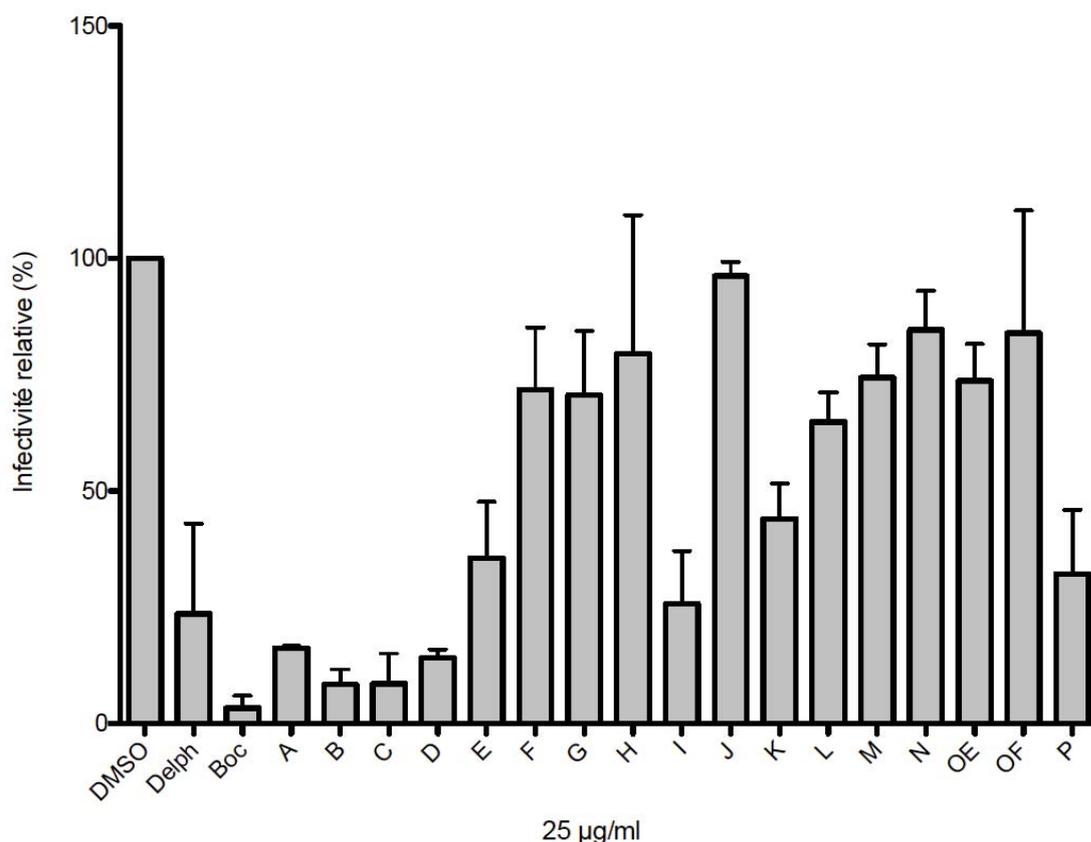


Figure 2: Activité anti-VHC des extraits bruts des différentes plantes de Côte d'Ivoire. Les extraits bruts sont incubés à 25 µg/ml avec le VHC durant 2h, puis après remplacement de l'inoculum, par du milieu pendant 28h, soit une durée totale de 30h. La delphinidine (50µM) est utilisée comme contrôle de l'étape d'entrée du VHC (2h) et le bocéprévir (Boc, 1µM) est utilisé comme contrôle lors de l'étape de réplication du VHC (28h).

Puis, ces deux extraits bruts B et C, ont été fractionnés par épuisement de la matière brute sèche avec différents solvants : (1) dichlorométhane, (2) méthanol et (3) éthanol/eau (1 :1) (Figure 2). Les sous-extraits obtenus sont annotés B1, B2, B3, C1, C2, et C3. Les sous-extraits B2 et C2 sont les plus actifs contre le VHC. Ils ont été obtenus avec le solvant méthanol.

Dans une troisième étape, les sous-extraits B2 et C2, ont été fractionnés par extraction liquide/liquide avec (1) l'acétate d'éthyle, (2) le méthanol et (3) l'eau. Les échantillons obtenus sont annotés B21, B22, B23, C21, C22, et C23 (Figure 3). Les échantillons les plus actifs sur l'étape d'entrée du VHC sont B21, B23 et C21.

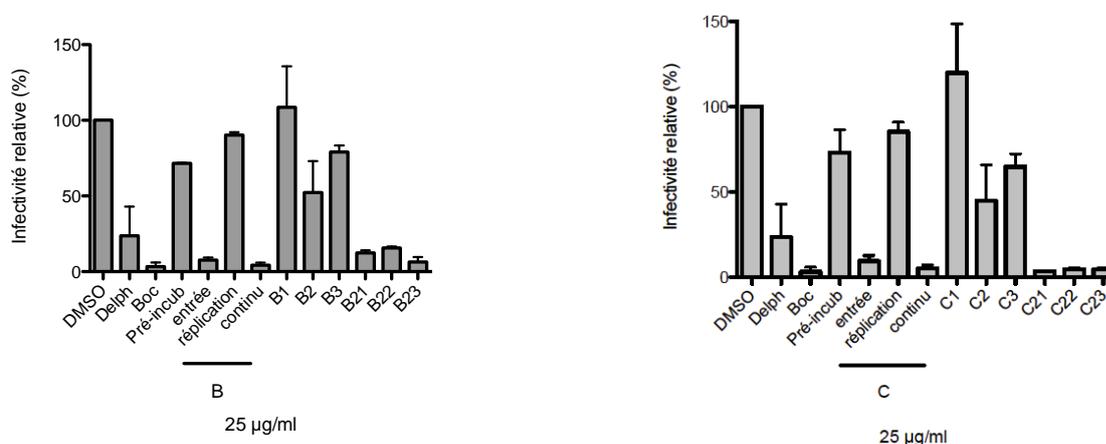


Figure 3: Activité antivirale des sous-extraits des plantes B et C. L'infection des cellules Huh-7 avec le VHC est réalisée en présence des extraits bruts (25µg/ml) en continu (30h) ou uniquement durant l'étape d'entrée (2h) ou de réplication (28h). Les sous-extraits obtenus par épuisement de l'extrait brut par différents solvants sont incubés avec les cellules Huh-7 pendant les 30h d'infection.

L'objectif, à présent, est d'essayer d'isoler les composés conférant la forte activité inhibitrice des échantillons B21, B23 et C21. Ces échantillons sont alors passés sur des colonnes spécifiques permettant de séparer les composés selon leur vitesse d'élution. Cette méthode permet alors d'obtenir entre 10 et 12 fractions dans lesquelles sont potentiellement présents les composés actifs contre le VHC. Pour l'échantillon B21, 10 fractions ont été collectées (Figure 4). Les composés les plus actifs contre le VHC sont regroupés dans les fractions F8 et F9. Grâce au travail de Moussa Bamba et Simon Bordage du laboratoire de pharmacognosie, les molécules connues dans la littérature présentes dans cette fraction ont été identifiées à l'aide de techniques de spectrométries et testés contre le VHC. Ces molécules ont été testées pour leur activité antivirale mais aucune n'a montré un effet inhibiteur sur l'entrée du VHC. Ceci permet de suggérer que le ou les composés actifs de l'extrait brut B soit des composés qui n'ont pas encore été identifiés dans le sous-extrait B21, soit que c'est la combinaison de ces molécules qui possède une activité antivirale. Des expériences sont actuellement en cours pour identifier de nouvelles molécules dans le sous-extrait B21. Une démarche similaire

d'identification des composés actifs est en cours pour les fractions de B23 (F5 à F10) (Figure 5) et C21 (F4 à F11) (Figure 6).

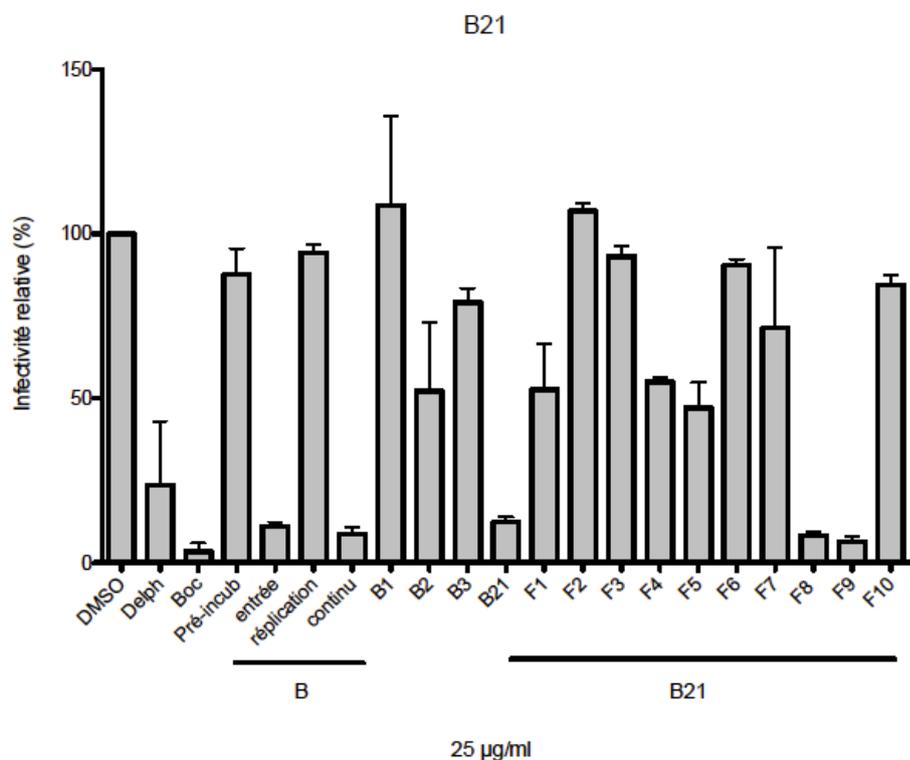


Figure 4: Activité anti-VHC des fractions obtenues après fractionnement de **B21**. Chacune des sous-fractions (F1 à F10) est testée à 25 µg/ml durant 30h.

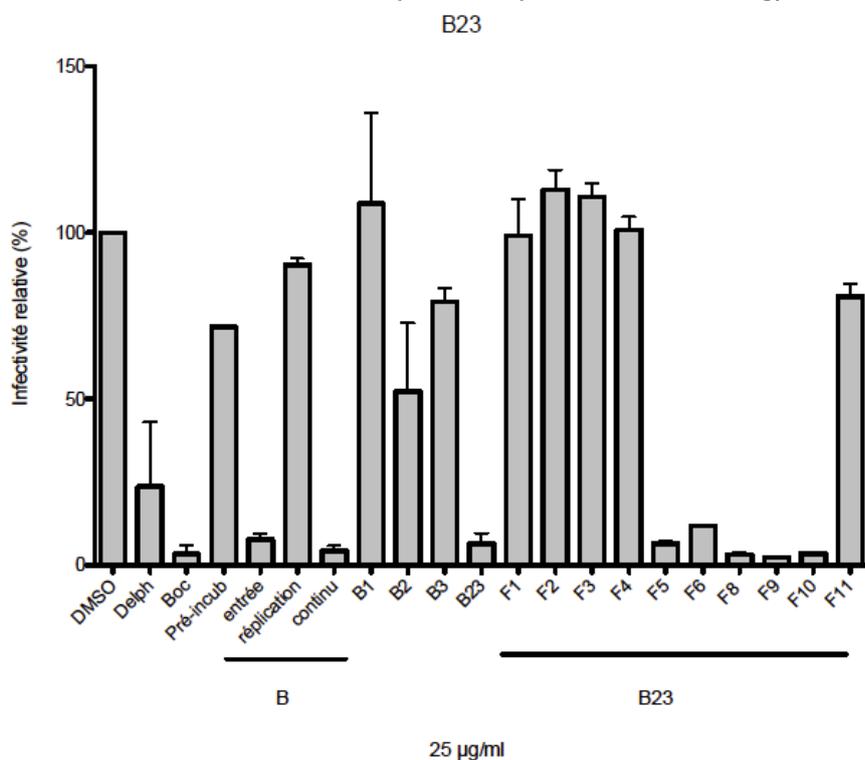


Figure 5: Activité anti-VHC des fractions obtenues après fractionnement de **B23**. Chacune des sous-fractions est testée à 25 µg/ml en continu durant 30h.

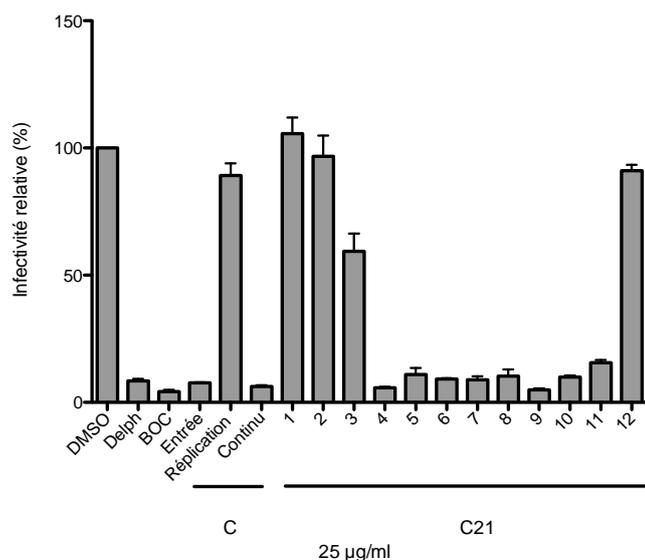


Figure 6: Activité anti-VHC des fractions obtenues après fractionnement de C21
Chacune des sous-fractions est testée à 25 µg/ml en continu durant 30h.

Le fractionnement bio-guidé consistant à isoler des composés actifs à partir de l'affinité des molécules pour différents solvants, s'avèrent être relativement coûteux et souvent toxique pour l'Homme et l'environnement. Dans ce contexte, afin d'optimiser les processus d'extraction dans une démarche plus durable, les éco-procédés d'extraction par ultrasons peuvent être intéressants pour isoler des molécules bioactives avec un gain de vitesse d'extraction et de rendement. Dans le cadre d'un projet collaboratif entre le laboratoire de Virologie Moléculaire et Cellulaire du CIIL, le laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Lille et le laboratoire ProBioGEM (Procédés Biologiques et Génie Enzymatique Microbien) de l'Université de Lille 1, des expériences d'écoextractions ont été réalisées à partir de **l'extrait bruts B** qui donnait les meilleures activités antivirales contre le VHC (Figure 7). Le meilleur solvant utilisé lors de ces tests est l'éthanol. En effet avec ce solvant il est observé une extraction des composés inhibiteurs ayant une forte inhibition sur le VHC. L'utilisation d'un solvant avec 25% ou 50% d'éthanol n'améliore pas le rendement d'extraction de composés inhibiteur du VHC. Les ultrasons, parfois utilisés dans une démarche d'extraction par éco-procédé, ne sont pas utiles dans ce cas car ils ne permettent pas d'extraire davantage de composés inhibiteurs du VHC. Afin de réaliser une première expérience de criblage de différentes plantes contre le VHC, l'eau à 40°C est le solvant le plus intéressant s'inscrivant parfaitement dans la démarche d'éco-procédé. Nous obtenons une extraction

de composés inhibiteurs du VHC très intéressante et suffisante avec ce solvant pour des premiers tests.

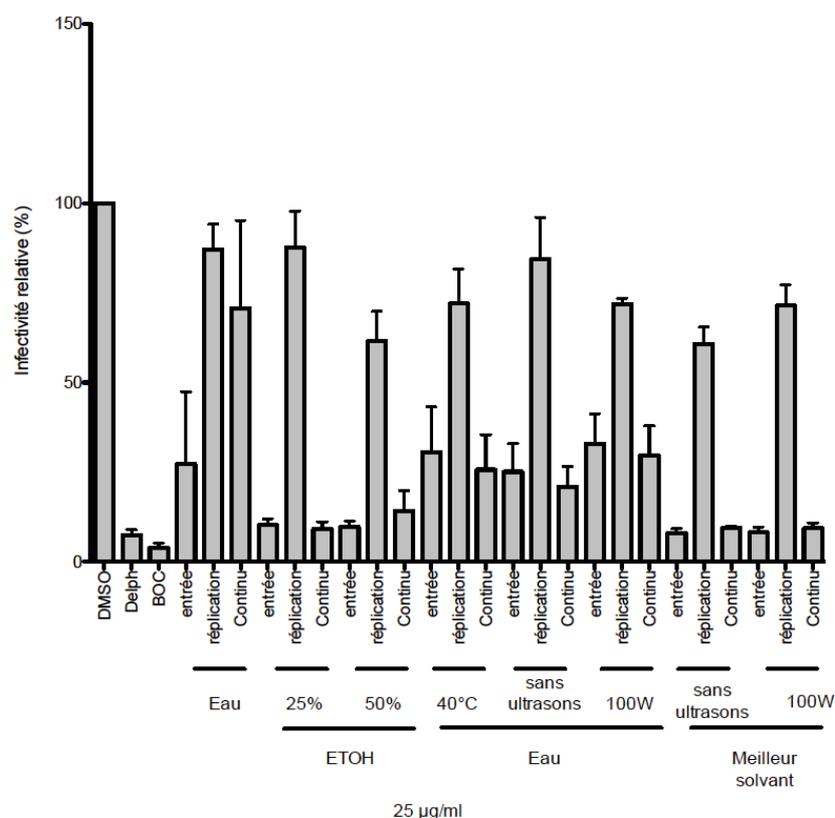


Figure 7 : Activité anti-VHC des différents écoextraits obtenus par le laboratoire ProBioGEM. Tous les extraits sont testés à 25µg/ml sur le VHC, soit durant l'étape d'entrée du VHC (2h), soit durant l'étape de réplication (28h) ou soit en continu. Le meilleur solvant utilisé est l'éthanol.

Conclusions

Nous avons identifié à l'issu d'un premier criblage que les extraits bruts des plantes *Carapa procera* (B) et *Pericopsis laxiflora* (C) ont une activité inhibitrice intéressante (environ 90%) sur l'infection VHC. Ces deux extraits actifs sur l'étape d'entrée du VHC ont été fractionnés afin d'essayer d'en isoler et d'identifier les principes actifs. Les sous fractions B21, B23 et C21 sont les plus actives et regroupent probablement les molécules actives contre le VHC. Une démarche d'identification de ces composés est en cours. Nous avons également pu montré que l'eau à 40°C pouvait être un solvant intéressant dans une démarche d'écoprocédé, car nous obtenons une extraction de composés inhibiteurs du VHC très importante et suffisante pour une première étape de criblage.

Discussions

Partie 1 : Nouveau mécanisme d'action de polyphénols inhibant l'entrée du VHC

L'étude du mécanisme d'action de l'EGCG et de la delphinidine sur le VHC a donné des résultats inattendus montrant une déformation des particules virales en présence des composés. Les expériences de cryo-microscopie électronique qui ont permis d'arriver à ces conclusions ont été réalisées avec des VHCpp et non avec des VHCcc, car, à l'époque où ont été réalisées ces expériences, il n'y avait pas de techniques décrites permettant d'observer les VHCcc en microscopie électronique avec une bonne résolution, à cause du manque de contraste probablement provoqué par la présence de l'enveloppe lipidique virale (Catanese et al., 2013). Tout récemment, une nouvelle technique de microscopie électronique a été mise au point permettant d'observer les lipo-viroparticules de VHC (Piver et al., 2016). Peut-être que cette nouvelle approche d'observation, s'affranchissant du manque de contraste de l'enveloppe virale, permettra prochainement d'observer les VHCcc en présence de nos molécules d'intérêts et de confirmer nos résultats.

D'après nos résultats, les déformations des VHCpp sont peut-être dues à l'agrégation de la protéine E2 (et peut-être E1), à la surface de la particule virale. Nous avons envisagé de marquer les protéines d'enveloppe avec des anticorps spécifiques couplés à des billes d'or et d'observer la localisation des protéines d'enveloppe sur les VHCpp déformées en microscopie électronique. De telles expériences sont en cours mais se heurtent à plusieurs problèmes techniques. En effet, l'inclusion des particules avant le marquage avec les anticorps afin de réaliser les observations de microscopie électronique, déforme les particules. Toutefois, si un regroupement des glycoprotéines d'enveloppe a lieu, nous espérons pouvoir observer un marquage concentré dans une zone de la surface des VHCpp.

Nous avons eu des difficultés à montrer par RMN s'il y avait une interaction entre l'EGCG et E2s. En effet dans un premier une interaction très forte entre E2s et l'EGCG (1 :200) a été observée. Nous n'avons pas réussi par la suite à isoler complètement la partie glycanique de la partie protéique de E2, cependant nous avons pu observer une interaction de l'EGCG avec la partie glycanique de E2. Ceci permet de suggérer que

l'EGCG inhibe probablement l'infection du VHC via une liaison aux glycanes se trouvant à la surface des particules virales.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons essayé d'obtenir des virus résistants à l'EGCG et la delphinidine afin d'identifier la cible protéique virale de ces molécules et confirmer ou non une potentielle interaction avec les protéines E1 et/ou E2. Après de nombreux essais utilisant des stratégies différentes, aucun virus résistant n'a été obtenu, ce qui peut s'expliquer si l'EGCG et la delphinidine, ont comme cible les glycanes des glycoprotéines d'enveloppe. De plus, le mode d'action des molécules, agissant sur la particule virale avant l'entrée, peut rendre difficile l'obtention de virus résistants.

Partie 2 : Identification du déhydrojuncusol, un composé naturel extrait du *J. maritimus*, un nouvel inhibiteur de la réplication du VHC

Huit extraits de plantes Tunisiennes avaient été sélectionnés par le laboratoire tunisien et le laboratoire de Pharmacognosie de Lille afin de caractériser leurs activités antibactériennes et antivirales. L'extrait de rhizomes de *J. maritimus* Lam s'est avéré être celui qui inhibait le plus efficacement l'infection du VHC. L'époque de l'année à laquelle la plante est récoltée est très importante car l'activité antivirale des extraits diffère en fonction de la date de collecte. En effet, les plantes de *J. maritimus* récoltées à l'automne ont des principes actifs qui ciblent préférentiellement l'étape de réplication du VHC (voir la partie « Résultats »). En revanche lorsque la plante est récoltée à la fin de l'hiver, l'extrait brut de rhizome est actif sur l'étape d'entrée ce qui semble montrer un changement de composition de la plante en composés bioactifs. Le dehydrojuncusol, qui inhibe la réplication du VHC, doit être absent du second extrait, ou présent de façon minoritaire. Il serait intéressant de procéder au fractionnement bio-guidé de ce second extrait afin d'isoler le(s) composé(s) inhibant l'entrée du VHC. En ce qui concerne l'extrait actif contre la réplication, la technique globale d'isolement des composés présents dans l'extrait brut de rhizome de *J. maritimus* puis retrouvés dans la fraction dichlorométhane est très fiable, et le déhydrojuncusol est le produit majoritaire comme le montre la figure 1 et la figure 2 en annexe.

Les différentes molécules ont été séparées par chromatographie en phase liquide à haute performance CLHP (Figure 1). Le pic 1 correspond à une molécule qui s'est avérée ne pas être active contre le VHC, le pic 3 correspond au déhydrojuncusol et le pic 2 correspond au juncusol qui a un faible effet sur la réplication du VHC. Le pic 4 se trouvant à droite du déhydrojuncusol correspond à l'ensemble des molécules présentes dans la fraction acétate d'éthyle : cette fraction s'est avérée peu active. Les pics correspondant au juncusol et au dehydrojuncusol sont bien conservés entre l'extrait brut et la fraction dichlorométhane. Nous n'avons pas pu tester en synergie l'effet du juncusol et du dehydrojuncusol sur l'infection du VHC car la quantité de juncusol purifiée était très faible.

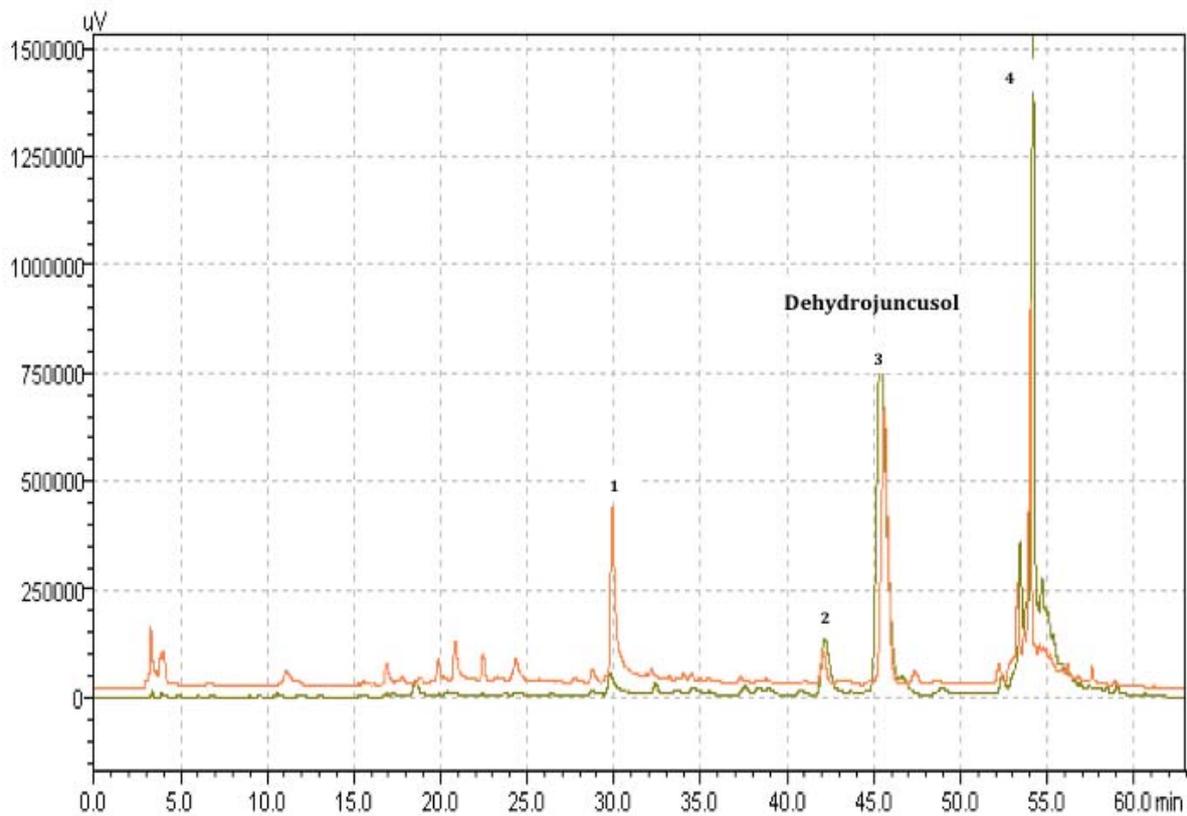


Figure 1: Chromatogramme obtenu par CLHP de l'extrait brut de rhizomes de *J. maritimus* et de la fraction dichlorométhane. Le déhydrojuncusol correspond au pic 3. L'extrait brut est représenté en orange tandis que la fraction dichlorométhane est représentée en vert.

Parmi les trois membres de la famille des *Flaviviridae* que nous avons testés, BVDV, YFV et VHC, le déhydrojuncusol agit spécifiquement contre le VHC ce qui laisse penser que ce virus agit spécifiquement sur une des protéines virales du VHC. Nous avons donc recherché la cible virale du déhydrojuncusol en isolant des mutants résistants. D'après nos résultats, il semble que la cible virale de la molécule soit NS5A car nous avons isolé un mutant portant la double mutation T24S-L31M dans NS5A et montré que ce mutant était résistant au déhydrojuncusol. De plus, le mutant résistant au daclatasvir NS5A Y93H est également résistant au déhydrojuncusol. Toutefois, cette résistance est partielle, ce qui laisse penser que même si NS5A est probablement la cible du déhydrojuncusol, son mécanisme d'action est différent du daclatasvir ou des autres inhibiteurs utilisés en thérapie. De façon intéressante, nous avons montré que le déhydrojuncusol inhibe efficacement la répllication du mutant résistant au daclatasvir

NS5A L31M retrouvé chez les patients traités. Cette mutation rend inefficace le traitement avec cette molécule. En effet les échecs de traitements observés avec le daclatasvir chez les patients sont de 63% pour la mutation L31M (Réunion mensuelle des hépatologues du Nord) Le double mutant de NS5A T24S-L31M est résistant au dehydrojuncusol mais il est retrouvé rarement chez les patients traités. En ce qui concerne le mutant NS5A Y93H, il est responsable de l'échec de la thérapie pour 14% des patients.

Conclusions et perspectives

Utiliser les molécules naturelles pour lutter contre le VHC et baisser le coût des traitements est une stratégie intéressante. Une étude a fait un parallèle *in vitro* entre les concentrations d'EGCG et de la silymarine utilisé en culture cellulaire, et les concentrations des DAAs utilisés lors des traitements (Khan 2015). L'EC₅₀ pour l'EGCG actif sur le génotype 1a du VHC est de 125 µM, ce qui semble très élevé vu nos résultats publiés (Calland et al., 2012 et 2015) alors que la concentration de tous les DAAs est inférieure à 1 µM. De la même manière, la dose létale 50 (CC₅₀) est de 128 µM alors que pour les DAAs elle est inférieure à 33 µM. Il semble peu envisageable d'utiliser l'EGCG tel quel mais des formes plus actives serait facilement disponible (Bhat et al., 2014). Le coût du traitement global pour les patients étant infectés par le génotype 1 du VHC sous sofosbuvir associé à un second inhibiteur pendant 12 semaines est de 41 000 euros (AFEF octobre 2016). Pour le moment, le moyen le plus efficace de lutte contre le VHC dans les pays ayant peu de ressources serait que les compagnies pharmaceutiques mettent en œuvre des programmes d'accessibilité. C'est le cas en Egypte pour les traitements combinant le sofosbuvir avec un inhibiteur de NS5A (ravidasvir), à l'intention des patients infectés par le génotype 4, pour lesquels le coût a été réduit à environ 300\$. Ce traitement est efficace à 100% pour les patients non cirrhotique et à 95% pour les autres patients étant au stade chronique de l'hépatite C.

En collaboration avec les pays ayant de faibles ressources dans le domaine de la santé, la recherche d'inhibiteurs naturels ayant une efficacité comparable aux DAAs reste un grand défi. En revanche ce travail est intéressant car il permet d'approfondir notre compréhension sur le mécanisme d'action de l'EGCG et de la delphinidine contre le VHC.

Dans l'optique de rechercher dans les plantes des inhibiteurs ayant une activité comparable aux DAAs, ce travail de thèse a permis d'identifier, dans une plante extrémophile tunisienne, un nouvel inhibiteur de la réplication virale ayant pour cible la protéine NS5A. Ce résultat arrive peut-être un peu tard dans la découverte de molécules anti-VHC, car l'arsenal thérapeutique actuel permet de lutter efficacement contre ce virus. Toutefois, cette molécule pourrait être utile dans le traitement des virus résistants mais également dans une utilisation en combinaison avec les traitements actuels, afin d'en réduire les coûts dans les pays en développement. Il pourrait être envisagé de procéder à des modifications chimiques du déhydrojuncusol afin d'augmenter son

efficacité, même si son EC_{50} de l'ordre du micromolaire est déjà très satisfaisant pour une molécule naturelle.

Bibliographie

A

- Abdely, C., 2011.** Halophyte-fodder species association may improve nutrient availability and biomass production of the Sabkha ecosystem.
- Abdely, C., 2006.** Potential utilisation of halophytes for the rehabilitation and valorisation of salt-affected areas in Tunisia.
- Abraham, G.M., Spooner, L.M., 2014.** Sofosbuvir in the Treatment of Chronic Hepatitis C: New Dog, New Tricks. *Clinical Infectious Diseases* 59, 411–415. doi:10.1093/cid/ciu265
- Adeyemo, O., Doi, H., Rajender Reddy, K., Kaplan, D.E., SyNCH Trial Investigators, 2013.** Impact of oral silymarin on virus- and non-virus-specific T-cell responses in chronic hepatitis C infection. *Journal of Viral Hepatitis* 20, 453–462. doi:10.1111/jvh.12050
- Afaq, F., Syed, D.N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M.-H., Khan, N., Zaid, M.A., Mukhtar, H., 2007.** Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *J Invest Dermatol* 127, 222–232. doi:10.1038/sj.jid.5700510
- Afdhal, N., Zeuzem, S., Kwo, P., Chojkier, M., Gitlin, N., Puoti, M., Romero-Gomez, M., Zarski, J.-P., Agarwal, K., Buggisch, P., Foster, G.R., Bräu, N., Buti, M., Jacobson, I.M., Subramanian, G.M., Ding, X., Mo, H., Yang, J.C., Pang, P.S., Symonds, W.T., McHutchison, J.G., Muir, A.J., Mangia, A., Marcellin, P., 2014.** Ledipasvir and Sofosbuvir for Untreated HCV Genotype 1 Infection. *New England Journal of Medicine* 370, 1889–1898. doi:10.1056/NEJMoa1402454
- Afzal, M.S., Zaidi, N.U.S.S., Dubuisson, J., Rouille, Y., 2014.** Hepatitis C virus capsid protein and intracellular lipids interplay and its association with hepatic steatosis. *Hepat Mon* 14, e17812. doi:10.5812/hepatmon.17812
- Ahmed, A., Keeffe, E., 1999.** Treatment strategies for chronic hepatitis C: update since the 1997 National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Journal of gastroenterology and hepatology* 14, S12–S18.
- Aiyer, H.S., Warri, A.M., Woode, D.R., Hilakivi-Clarke, L., Clarke, R., 2012.** Influence of Berry Polyphenols on Receptor Signaling and Cell-Death Pathways: Implications for Breast Cancer Prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 5693–5708. doi:10.1021/jf204084f
- Akazawa, D., Moriyama, M., Yokokawa, H., Omi, N., Watanabe, N., Date, T., Morikawa, K., Aizaki, H., Ishii, K., Kato, T., Mochizuki, H., Nakamura, N., Wakita, T., 2013.** Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology* 145, 447–455–4. doi:10.1053/j.gastro.2013.05.007

- Al Olaby, R.R., Cocquerel, L., Zemla, A., Saas, L., Dubuisson, J., Vielmetter, J., Marcotrigiano, J., Khan, A.G., Vences Catalan, F., Perryman, A.L., Freundlich, J.S., Forli, S., Levy, S., Balhorn, R., Azzazy, H.M., 2014.** Identification of a novel drug lead that inhibits HCV infection and cell-to-cell transmission by targeting the HCV E2 glycoprotein. *PLoS One* 9, e111333. doi:10.1371/journal.pone.0111333
- Albecka, A., Belouzard, S., de Beeck, A.O., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Tercé, F., Duverlie, G., Rouillé, Y., Dubuisson, J., 2012.** Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 55, 998–1007.
- Albecka, A., Montserret, R., Krey, T., Tarr, A.W., Diesis, E., Ball, J.K., Descamps, V., Duverlie, G., Rey, F., Penin, F., Dubuisson, J., 2011.** Identification of new functional regions in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol* 85, 1777–1792. doi:10.1128/JVI.02170-10
- Albertoni, G., Castelo Girão, M.J.B., Schor, N., 2014.** Mini review: Current molecular methods for the detection and quantification of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1. *International Journal of Infectious Diseases* 25, 145–149. doi:10.1016/j.ijid.2014.04.007
- Ali, N., Siddiqui, A., 1997.** The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2249–2254.
- Ali, S., Pellerin, C., Lamarre, D., Kukolj, G., 2004.** Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line. *J Virol* 78, 491–501.
- Allain, J.-P., Dong, Y., Vandamme, A.-M., Moulton, V., Salemi, M., 2000.** Evolutionary rate and genetic drift of hepatitis C virus are not correlated with the host immune response: studies of infected donor-recipient clusters. *Journal of Virology* 74, 2541–2549.
- Almeida, C.M.R., Mucha, A.P., da Silva, M.N., Monteiro, M., Salgado, P., Necrasov, T., Magalhães, C., 2014.** Salt marsh plants as key mediators on the level of cadmium impact on microbial denitrification. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 10270–10278. doi:10.1007/s11356-014-2953-1
- Almeida, C.M.R., Mucha, A.P., Vasconcelos, M.T.S.D., 2006a.** Variability of metal contents in the sea rush *Juncus maritimus*–estuarine sediment system through one year of plant's life. *Marine Environmental Research* 61, 424–438. doi:10.1016/j.marenvres.2005.12.002
- Almeida, C.M.R., Mucha, A.P., Vasconcelos, M.T.S.D., 2006b.** Comparison of the role of the sea club-rush *Scirpus maritimus* and the sea rush *Juncus maritimus* in terms of concentration, speciation and bioaccumulation of metals in the estuarine

sediment. *Environ Pollut* 142, 151–159. doi:10.1016/j.envpol.2005.09.002

Almeida, C.M.R., Mucha, A.P., Vasconcelos, M.T.S.D., 2005. The role of a salt marsh plant on trace metal bioavailability in sediments. Estimation by different chemical approaches. *Environ Sci Pollut Res Int* 12, 271–277.

Almeida, C.M.R., Mucha, A.P., Vasconcelos, M.T.S.D., 2004. Influence of the sea rush *Juncus maritimus* on metal concentration and speciation in estuarine sediment colonized by the plant. *Environ Sci Technol* 38, 3112–3118.

Alric, L., Bonnet, D., 2016. Grazoprevir + elbasvir for the treatment of hepatitis C virus infection. *Expert Opin Pharmacother* 17, 735–742. doi:10.1517/14656566.2016.1161028

Alric, L., Fort, M., Izopet, J., Vinel, J.P., Charlet, J.P., Selves, J., Puel, J., Pascal, J.P., Duffaut, M., Abbal, M., 1997. Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 113, 1675–1681.

Alsaleh, K., Delavalle, P.-Y., Pillez, A., Duverlie, G., Descamps, V., Rouille, Y., Dubuisson, J., Wychowski, C., 2010. Identification of basic amino acids at the N-terminal end of the core protein that are crucial for hepatitis C virus infectivity. *J Virol* 84, 12515–12528. doi:10.1128/JVI.01393-10

Alter, H.J., Holland, P.V., Purcell, R.H., Lander, J.J., Feinstone, S.M., Morrow, A.G., Schmidt, P.J., 1972. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 77, 691–699.

Alter, M.J., Kruszon-Moran, D., Nainan, O.V., McQuillan, G.M., Gao, F., Moyer, L.A., Kaslow, R.A., Margolis, H.S., 1999. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *New England journal of medicine* 341, 556–562.

Althagafy, H.S., Graf, T.N., Sy-Cordero, A.A., Gufford, B.T., Paine, M.F., Wagoner, J., Polyak, S.J., Croatt, M.P., Oberlies, N.H., 2013. Semisynthesis, cytotoxicity, antiviral activity, and drug interaction liability of 7-O-methylated analogues of flavonolignans from milk thistle. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21, 3919–3926. doi:10.1016/j.bmc.2013.04.017

Alvarez-Lajonchere, L., Shoukry, N.H., Gra, B., Amador-Canizares, Y., Helle, F., Bedard, N., Guerra, I., Drouin, C., Dubuisson, J., Gonzalez-Horta, E.E., Martinez, G., Marante, J., Cinza, Z., Castellanos, M., Duenas-Carrera, S., 2009. Immunogenicity of CIGB-230, a therapeutic DNA vaccine preparation, in. *J Viral Hepat* 16, 156–167. doi:10.1111/j.1365-2893.2008.01058.x

Andrae-Marobela, K., Ghislain, F.W., Okatch, H., Majinda, R.R.T., 2013. Polyphenols: A Diverse Class of Multi-Target Anti-HIV-1 Agents. *Current Drug Metabolism* 14, 392–413. doi:10.2174/13892002113149990095

- Anggakusuma, Colpitts, C.C., Schang, L.M., Rachmawati, H., Frentzen, A., Pfaender, S., Behrendt, P., Brown, R.J.P., Bankwitz, D., Steinmann, J., Ott, M., Meuleman, P., Rice, C.M., Ploss, A., Pietschmann, T., Steinmann, E., 2014.** Turmeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells. *Gut* 63, 1137–1149. doi:10.1136/gutjnl-2012-304299
- Anjum, N.A., Duarte, A.C., Pereira, E., Ahmad, I., 2015.** *Juncus maritimus* root biochemical assessment for its mercury stabilization potential in Ria de Aveiro coastal lagoon (Portugal). *Environmental Science and Pollution Research* 22, 2231–2238. doi:10.1007/s11356-014-3455-x
- Anjum, N.A., Duarte, A.C., Pereira, E., Ahmad, I., 2014.** Oxidative stress status, antioxidant metabolism and polypeptide patterns in *Juncus maritimus* shoots exhibiting differential mercury burdens in Ria de Aveiro coastal lagoon (Portugal). *Environmental Science and Pollution Research* 21, 6652–6661. doi:10.1007/s11356-014-2578-4
- Antonello, V.S., Antonello, I.C.F., Zaltron, R.F., Tovo, C.V., 2016.** HIV and Hepatitis C virus coinfection. Who is this patient today? *Arq Gastroenterol* 53, 180–184. doi:10.1590/S0004-28032016000300011
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., Bartenschlager, R., 2008.** Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. *PLoS Pathogens* 4, e1000035. doi:10.1371/journal.ppat.1000035
- Aras, A., Khokhar, A.R., Qureshi, M.Z., Silva, M.F., Sobczak-Kupiec, A., Pineda, E.A.G., Hechenleitner, A.A.W., Farooqi, A.A., 2014.** Targeting Cancer with Nano-Bullets: Curcumin, EGCG, Resveratrol and Quercetin on Flying Carpets. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15, 3865–3871. doi:10.7314/APJCP.2014.15.9.3865
- Ashfaq, U.A., Javed, T., Rehman, S., Nawaz, Z., Riazuddin, S., 2011.** Inhibition of HCV 3a core gene through Silymarin and its fractions. *Virol J* 8, 153. doi:10.1186/1743-422X-8-153
- Ashfaq, U.A., Masoud, M.S., Nawaz, Z., Riazuddin, S., 2011.** Glycyrrhizin as antiviral agent against Hepatitis C Virus. *J Transl Med* 9, 112. doi:10.1186/1479-5876-9-112
- Asselah, T., 2011.** Realize the advance in HCV treatment, but remain cautious. *Journal of hepatology* 55, 1457–1460.
- Aydin, C., Mukherjee, S., Hanson, A.M., Frick, D.N., Schiffer, C.A., 2013.** The interdomain interface in bifunctional enzyme protein 3/4A (NS3/4A) regulates protease and helicase activities. *Protein Sci* 22, 1786–1798. doi:10.1002/pro.2378

B

- Bachmetov, L., Gal-Tanamy, M., Shapira, A., Vorobeychik, M., Giterman-Galam, T., Sathiyamoorthy, P., Golan-Goldhirsh, A., Benhar, I., Tur-Kaspa, R., Zemel, R., 2012.** Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity: Quercetin suppresses HCV through inhibition of NS3. *Journal of Viral Hepatitis* 19, e81–e88. doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01507.x
- Bacon, B.R., Gordon, S.C., Lawitz, E., Marcellin, P., Vierling, J.M., Zeuzem, S., Poordad, F., Goodman, Z.D., Sings, H.L., Boparai, N., Burroughs, M., Brass, C.A., Albrecht, J.K., Esteban, R., 2011.** Boceprevir for Previously Treated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *New England Journal of Medicine* 364, 1207–1217. doi:10.1056/NEJMoa1009482
- Bagchi, D., Sen, C.K., Ray, S.D., Das, D.K., Bagchi, M., Preuss, H.G., Vinson, J.A., 2003.** Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 523–524, 87–97. doi:10.1016/S0027-5107(02)00324-X
- Bahramsoltani, R., Sodagari, H.R., Farzaei, M.H., Abdolghaffari, A.H., Gooshe, M., Rezaei, N., 2016.** The preventive and therapeutic potential of natural polyphenols on influenza. *Expert Rev Anti Infect Ther* 14, 57–80. doi:10.1586/14787210.2016.1120670
- Bailony, M.R., Scherzer, R., Huhn, G., Plankey, M.W., Peters, M.G., Tien, P.C., 2013.** Association of HIV infection, hepatitis C virus infection, and metabolic factors with liver stiffness measured by transient elastography. *J Infect Dis* 208, 1776–1783. doi:10.1093/infdis/jit357
- Balagopal, A., Thomas, D.L., Thio, C.L., 2010.** IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 139, 1865–1876. doi:10.1053/j.gastro.2010.10.004
- Bamber, M., Murray, A.K., Weller, I.V., Morelli, A., Scheuer, P.J., Thomas, H.C., Sherlock, S., 1981.** Clinical and histological features of a group of patients with sporadic non-A, non-B hepatitis. *J Clin Pathol* 34, 1175–1180.
- Bankwitz, D., Vieyres, G., Hueging, K., Bitzegeio, J., Doepke, M., Chhatwal, P., Haid, S., Catanese, M.T., Zeisel, M.B., Nicosia, A., Baumert, T.F., Kaderali, L., Pietschmann, T., 2014.** Role of hypervariable region 1 for the interplay of hepatitis C virus with entry factors and lipoproteins. *J Virol* 88, 12644–12655. doi:10.1128/JVI.01145-14
- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M.J., Miyamura, T., others, 1997.** Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 1200–1205.

- Barnes, E., Folgori, A., Capone, S., Swadling, L., Aston, S., Kurioka, A., Meyer, J., Huddart, R., Smith, K., Townsend, R., Brown, A., Antrobus, R., Ammendola, V., Naddeo, M., O'Hara, G., Willberg, C., Harrison, A., Grazioli, F., Esposito, M.L., Siani, L., Traboni, C., Oo, Y., Adams, D., Hill, A., Colloca, S., Nicosia, A., Cortese, R., Klenerman, P., 2012.** Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Sci Transl Med* 4, 115ra1. doi:10.1126/scitranslmed.3003155
- Bartenschlager, R. (Ed.), 2013.** Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Bartenschlager, R., Cosset, F.-L., Lohmann, V., 2010.** Hepatitis C virus replication cycle. *J Hepatol* 53, 583–585. doi:10.1016/j.jhep.2010.04.015
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., Penin, F., 2013.** The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Microbiology* 11, 482–496. doi:10.1038/nrmicro3046
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., André, P., 2011.** Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in Microbiology* 19, 95–103. doi:10.1016/j.tim.2010.11.005
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T.H., Depla, E., Von Weizsacker, F., Blum, H.E., Baumert, T.F., 2003.** Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278, 41003–41012. doi:10.1074/jbc.M302267200
- 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., 2006.** Viral and Cellular Determinants of the Hepatitis C Virus Envelope-Heparan Sulfate Interaction. *Journal of Virology* 80, 10579–10590. doi:10.1128/JVI.00941-06
- Bartosch, B., Dubuisson, J., Cosset, F.-L., 2003a.** Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes. *Journal of Experimental Medicine* 197, 633–642. doi:10.1084/jem.20021756
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A., Cosset, F.-L., 2003b.** Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 278, 41624–41630. doi:10.1074/jbc.M305289200
- Bataller, R., Brenner, D.A., 2005.** Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 115, 209–218. doi:10.1172/JCI200524282
- Beaumont, E., Patient, R., Hourieux, C., Dimier-Poisson, I., Roingeard, P., 2013.** Chimeric hepatitis B virus/hepatitis C virus envelope proteins elicit broadly

neutralizing antibodies and constitute a potential bivalent prophylactic vaccine. *Hepatology* 57, 1303–1313. doi:10.1002/hep.26132

Beglova, N., Blacklow, S.C., 2005. The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 309–317. doi:10.1016/j.tibs.2005.03.007

Behery, F.A.A., Naeem, Z.-E.M., Maatooq, G.T., Amer, M.M.A., Ahmed, A.F., 2013. A novel antioxidant phenanthrenoid dimer from *Juncus acutus* L. *Natural Product Research* 27, 155–163. doi:10.1080/14786419.2012.662759

Behery, F.A.A., Naeem, Z.E.M., Maatooq, G.T., Amer, M.M.A., Wen, Z.-H., Sheu, J.-H., Ahmed, A.F., 2007. Phenanthrenoids from *Juncus acutus* L., new natural lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 55, 1264–1266.

Behrens, S.-E., Tomei, L., De Francesco, R., 1996. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *The EMBO journal* 15, 12.

Beinhardt, S., Rasoul-Rockenschaub, S., Scherzer, T.M., Ferenci, P., 2011. Silibinin monotherapy prevents graft infection after orthotopic liver transplantation in a patient with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 54, 591-2-593. doi:10.1016/j.jhep.2010.09.009

Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., Barreiro, O., Maldonado-Rodríguez, A., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Aldabe, R., López-Cabrera, M., Majano, P.L., 2008. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* 48, 1044–1053. doi:10.1002/hep.22465

Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernandez, A., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M., Majano, P.L., 2009. The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol* 83, 8012–8020. doi:10.1128/JVI.00038-09

Benhamou, Y., Bochet, M., Di Martino, V., Charlotte, F., Azria, F., Coutellier, A., Vidaud, M., Bricaire, F., Opolon, P., Katlama, C., others, 1999. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. *Hepatology* 30, 1054–1058.

Benitez, L., de Mendoza, C., 2015. Hepatitis B Reactivation During Successful HCV Therapy. *AIDS Rev* 17, 186.

Berdichevsky, Y., Zemel, R., Bachmatov, L., Abramovich, A., Koren, R., Sathiyamoorthy, P., Golan-Goldhirsh, A., Tur-Kaspa, R., Benhar, I., 2003. A novel high throughput screening assay for HCV NS3 serine protease inhibitors. *J Virol Methods* 107, 245–255.

Berenguer, M., Ferrell, L., Watson, J., Prieto, M., Kim, M., Rayón, M., Córdoba, J.,

- Herola, A., Ascher, N., Mir, J., others, 2000.** HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *Journal of hepatology* 32, 673–684.
- Bettuzzi, S., 2006.** Chemoprevention of Human Prostate Cancer by Oral Administration of Green Tea Catechins in Volunteers with High-Grade Prostate Intraepithelial Neoplasia: A Preliminary Report from a One-Year Proof-of-Principle Study. *Cancer Research* 66, 1234–1240. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1145
- Bhagani, S., 2009.** HIV/hepatitis C co-infection and hepatic fibrosis: looking beyond HIV-associated immune suppression; the contribution of hepatic steatosis and insulin resistance. *Gut* 58, 1579–1581. doi:10.1136/gut.2009.184473
- Bhat, P., Gnanasundram, S.V., Mani, P., Ray, P.S., Sarkar, D.P., Das, S., 2012.** Targeting ribosome assembly on the HCV RNA using a small RNA molecule. *RNA Biol* 9, 1110–1119. doi:10.4161/rna.21208
- Bhat, R., Adam, A.T., Lee, J.J., Deloison, G., Rouillé, Y., Séron, K., Rotella, D.P., 2014.** Structure–activity studies of (–)-epigallocatechin gallate derivatives as HCV entry inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24, 4162–4165. doi:10.1016/j.bmcl.2014.07.051
- Bigger, C.B., Brasky, K.M., Lanford, R.E., 2001.** DNA Microarray Analysis of Chimpanzee Liver during Acute Resolving Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* 75, 7059–7066. doi:10.1128/JVI.75.15.7059-7066.2001
- Bility, M.T., Curtis, A., Su, L., 2014.** A chimeric mouse model to study immunopathogenesis of HCV infection. *Methods Mol Biol* 1213, 379–388. doi:10.1007/978-1-4939-1453-1_31
- Bitzegeio, J., Bankwitz, D., Hueging, K., Haid, S., Brohm, C., Zeisel, M.B., Herrmann, E., Iken, M., Ott, M., Baumert, T.F., Pietschmann, T., 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. doi:10.1371/journal.ppat.1000978
- Bjoro, K., Froland, S.S., Yun, Z., Samdal, H.H., Haaland, T., 1994.** Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinemia after treatment with contaminated immune globulin. *N Engl J Med* 331, 1607–1611. doi:10.1056/NEJM199412153312402
- Blaising, J., Lévy, P.L., Gondeau, C., Phelip, C., Varbanov, M., Teissier, E., Ruggiero, F., Polyak, S.J., Oberlies, N.H., Ivanovic, T., Boulant, S., Pécheur, E.-I., 2013a.** Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking: Silibinin inhibition of viral entry. *Cellular Microbiology* n/a-n/a. doi:10.1111/cmi.12155
- Blaising, J., Levy, P.L., Polyak, S.J., Stanifer, M., Boulant, S., Pecheur, E.-I., 2013b.** Arbidol inhibits viral entry by interfering with clathrin-dependent trafficking.

- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., Rouille, Y., 2006.** Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology* 80, 6964–6972. doi:10.1128/JVI.00024-06
- Blight, K.J., McKeating, J.A., Rice, C.M., 2002.** Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology* 76, 13001–13014. doi:10.1128/JVI.76.24.13001-13014.2002
- Blumberg, B.S., Alter, H.J., Visnich, S., 1965.** A “new” antigen in leukemia sera. *Jama* 191, 541–546.
- Boermans, H.J., Percy, D.H., Stirtzinger, T., Croy, B.A., 1992.** Engraftment of severe combined immune deficient/beige mice with bovine foetal lymphoid tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 34, 273–289.
- Boni, S., Lavergne, J.-P., Boulant, S., Cahour, A., 2005.** Hepatitis C Virus Core Protein Acts as a trans-Modulating Factor on Internal Translation Initiation of the Viral RNA. *Journal of Biological Chemistry* 280, 17737–17748. doi:10.1074/jbc.M501826200
- Bonafous, P., Perrault, M., Le Bihan, O., Bartosch, B., Lavillette, D., Penin, F., Lambert, O., Pecheur, E.-I., 2010.** Characterization of hepatitis C virus pseudoparticles by cryo-transmission electron microscopy using functionalized magnetic nanobeads. *Journal of General Virology* 91, 1919–1930. doi:10.1099/vir.0.021071-0
- Boscaiu, M., Lull, C., Llinares, J., Vicente, O., Boira, H., 2013.** Proline as a biochemical marker in relation to the ecology of two halophytic *Juncus* species. *Journal of Plant Ecology* 6, 177–186. doi:10.1093/jpe/rts017
- Boulant, S., 2006.** Structural Determinants That Target the Hepatitis C Virus Core Protein to Lipid Droplets. *Journal of Biological Chemistry* 281, 22236–22247. doi:10.1074/jbc.M601031200
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F., Lavergne, J.-P., 2005.** Hepatitis C Virus Core Protein Is a Dimeric Alpha-Helical Protein Exhibiting Membrane Protein Features. *Journal of Virology* 79, 11353–11365. doi:10.1128/JVI.79.17.11353-11365.2005
- Boyd, S.D., Tracy, L., Komatsu, T.E., Harrington, P.R., Viswanathan, P., Murray, J., Sherwat, A., 2017.** US FDA Perspective on Elbasvir/Grazoprevir Treatment for Patients with Chronic Hepatitis C Virus Genotype 1 or 4 Infection. *Clin Drug Investig*. doi:10.1007/s40261-017-0492-5
- Brass, V., Berke, J.M., Montserret, R., Blum, H.E., Penin, F., Moradpour, D., 2008.** Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14545–

14550. doi:10.1073/pnas.0807298105

- Brass, V., Gosert, R., Moradpour, D., 2009.** Investigation of the hepatitis C virus replication complex. *Methods Mol Biol* 510, 195–209. doi:10.1007/978-1-59745-394-3_15
- Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M., Crotta, S., 2008.** CD81 Is a Central Regulator of Cellular Events Required for Hepatitis C Virus Infection of Human Hepatocytes. *Journal of Virology* 82, 8316–8329. doi:10.1128/JVI.00665-08
- Brillanti, S., Garson, J., Foli, M., Whitby, Kevin, Deaville, R., Masci, C., Miglioli, M., Barbara, L., 1994.** A Pilot Study of Combination Therapy With Ribavirin Interferon Alfa for Interferon Alfa-Resistant Chronic Hepatitis C.
- 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., Wong-Staal, F., Balfe, P., McKeating, J.A., 2011.** Neutralizing Antibody-Resistant Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission. *Journal of Virology* 85, 596–605. doi:10.1128/JVI.01592-10
- Brown, E.A., Zhang, H., Ping, L.-H., Lemon, S.M., 1992.** Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic acids research* 20, 5041–5045.
- Brown, M.D., 1999.** Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer. *Altern Med Rev* 4, 360–370.
- Brown, R.C., Lockwood, A.H., Sonawane, B.R., 2005.** Neurodegenerative Diseases: An Overview of Environmental Risk Factors. *Environmental Health Perspectives* 113, 1250–1256. doi:10.1289/ehp.7567
- Bruggmann, P., Berg, T., Ovrehus, A.L.H., Moreno, C., Brandao Mello, C.E., Roudot-Thoraval, F., Marinho, R.T., Sherman, M., Ryder, S.D., Sperl, J., Akarca, U., Balik, I., Bihl, F., Bilodeau, M., Blasco, A.J., Buti, M., Calinas, F., Calleja, J.L., Cheinquer, H., Christensen, P.B., Clausen, M., Coelho, H.S.M., Cornberg, M., Cramp, M.E., Dore, G.J., Doss, W., Duberg, A.S., El-Sayed, M.H., Ergor, G., Esmat, G., Estes, C., Falconer, K., Felix, J., Ferraz, M.L.G., Ferreira, P.R., Frankova, S., Garcia-Samaniego, J., Gerstoft, J., Gira, J.A., Goncales, F.L.J., Gower, E., Gschwantler, M., Guimaraes Pessoa, M., Hezode, C., Hofer, H., Husa, P., Idilman, R., Kaberg, M., Kaita, K.D.E., Kautz, A., Kaymakoglu, S., Krajdén, M., Krarup, H., Laleman, W., Lavanchy, D., Lazaro, P., Marotta, P., Mauss, S., Mendes Correa, M.C., Mullhaupt, B., Myers, R.P., Negro, F., Nemecek, V., Ormeci, N., Parkes, J., Peltekian, K.M., Ramji, A., Razavi, H., Reis, N., Roberts, S.K., Rosenberg, W.M., Sarmiento-Castro, R., Sarrazin, C., Semela, D., Shiha, G.E., Sievert, W., Starkel, P., Stauber, R.E., Thompson, A.J., Urbanek, P., van Thiel, I., Van Vlierberghe, H., Vandijck, D., Vogel, W., Waked, I., Wedemeyer, H., Weis, N., Wiegand, J., Yosry, A., Zekry, A., Van Damme, P., Aleman, S., Hindman, S.J., 2014.** Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *J Viral Hepat* 21 Suppl 1, 5–33.

doi:10.1111/jvh.12247

- Bukh, J., 2016.** The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J Hepatol* 65, S2–S21. doi:10.1016/j.jhep.2016.07.035
- Bukh, J., 2004.** A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* 39, 1469–1475. doi:10.1002/hep.20268
- Bukh, J., Forns, X., Emerson, S.U., Purcell, R.H., 2001.** Studies of hepatitis C virus in chimpanzees and their importance for vaccine development. *Intervirology* 44, 132–142. doi:50040
- Bukh, J., Miller, R.H., Purcell, R.H., 1995.** Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 15, 41–63. doi:10.1055/s-2007-1007262
- Bukh, J., Purcell, R.H., Miller, R.H., 1992.** Sequence analysis of the 5′noncoding region of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 4942–4946.
- Burlone, M.E., Budkowska, A., 2009.** Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *Journal of General Virology* 90, 1055–1070. doi:10.1099/vir.0.008300-0
- Bush, C.O., Greenstein, A.E., Delaney, W.E., Beran, R.K.F., 2013.** Hepatitis C Viral Entry Inhibitors Prolong Viral Suppression by Replication Inhibitors in Persistently-Infected Huh7 Cultures. *PLoS ONE* 8, e65273. doi:10.1371/journal.pone.0065273

C

- Cabrera, C., Artacho, R., Gimenez, R., 2006.** Beneficial effects of green tea--a review. *J Am Coll Nutr* 25, 79–99.
- Calland, N., Dubuisson, J., Rouillé, Y., Séron, K., 2012.** Hepatitis C Virus and Natural Compounds: A New Antiviral Approach? *Viruses* 4, 2197–2217. doi:10.3390/v4102197
- Calland, N., Sahuc, M.-E., Belouzard, S., Pène, V., Bonnafous, P., Mesalam, A.A., Deloison, G., Descamps, V., Sahpaz, S., Wychowski, C., Lambert, O., Brodin, P., Duverlie, G., Meuleman, P., Rosenberg, A.R., Dubuisson, J., Rouillé, Y., Séron, K., 2015.** Polyphenols Inhibit Hepatitis C Virus Entry by a New Mechanism of Action. *Journal of Virology* 89, 10053–10063. doi:10.1128/JVI.01473-15

- Callens, N., Ciczora, Y., Bartosch, B., Vu-Dac, N., Cosset, F.-L., Pawlotsky, J.-M., Penin, F., Dubuisson, J., 2005.** Basic Residues in Hypervariable Region 1 of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Contribute to Virus Entry. *Journal of Virology* 79, 15331–15341. doi:10.1128/JVI.79.24.15331-15341.2005
- Cao, M.-M., Zhang, Y., Li, X.-H., Peng, Z.-G., Jiang, J.-D., Gu, Y.-C., Di, Y.-T., Li, X.-N., Chen, D.-Z., Xia, C.-F., He, H.-P., Li, S.-L., Hao, X.-J., 2014.** Cyclohexane-fused octahydroquinolizine alkaloids from *Myriophyllum faberi* with activity against hepatitis C virus. *J Org Chem* 79, 7945–7950. doi:10.1021/jo501076x
- Carneiro, B.M., Batista, M.N., Braga, A.C.S., Nogueira, M.L., Rahal, P., 2016.** The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology* 496, 215–218. doi:10.1016/j.virol.2016.06.012
- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., Dubuisson, J., 2002.** Subcellular Localization and Topology of the p7 Polypeptide of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* 76, 3720–3730. doi:10.1128/JVI.76.8.3720-3730.2002
- Castelain, S., Descamps, V., Thibault, V., François, C., Bonte, D., Morel, V., Izopet, J., Capron, D., Zawadzki, P., Duverlie, G., 2004.** TaqMan amplification system with an internal positive control for HCV RNA quantitation. *Journal of Clinical Virology* 31, 227–234. doi:10.1016/j.jcv.2004.03.009
- Castro, R., Pereira, S., Lima, A., Corticeiro, S., Valega, M., Pereira, E., Duarte, A., Figueira, E., 2009.** Accumulation, distribution and cellular partitioning of mercury in several halophytes of a contaminated salt marsh. *Chemosphere* 76, 1348–1355. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.06.033
- Catanese, M.T., Ansuini, H., Graziani, R., Huby, T., Moreau, M., Ball, J.K., Paonessa, G., Rice, C.M., Cortese, R., Vitelli, A., Nicosia, A., 2010.** Role of Scavenger Receptor Class B Type I in Hepatitis C Virus Entry: Kinetics and Molecular Determinants. *Journal of Virology* 84, 34–43. doi:10.1128/JVI.02199-08
- Catanese, M.T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T.J., Andrus, L., Rice, W.J., Silvestry, M., Kuhn, R.J., Rice, C.M., 2013.** Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 9505–9510. doi:10.1073/pnas.1307527110
- Center for History and New Media, n.d. Guide rapide pour débuter [WWW Document]. URL http://zotero.org/support/quick_start_guide
- Cesoniene, L., Jasutiene, I., Sarkinas, A., 2009.** Phenolics and anthocyanins in berries of European cranberry and their antimicrobial activity. *Medicina (Kaunas)* 45, 992–999.
- Chahine, E.B., Sucher, A.J., Hemstreet, B.A., 2016.** Sofosbuvir/Velpatasvir: The First Pangenotypic Direct-Acting Antiviral Combination for Hepatitis C. *Ann Pharmacother.* doi:10.1177/1060028016668897

- Chamoun-Emanuelli, A.M., Pecheur, E.-I., Chen, Z., 2014.** Benzhydrylpiperazine compounds inhibit cholesterol-dependent cellular entry of hepatitis C virus. *Antiviral Res* 109, 141–148. doi:10.1016/j.antiviral.2014.06.014
- Chamoun-Emanuelli, A.M., Pecheur, E.-I., Simeon, R.L., Huang, D., Cremer, P.S., Chen, Z., 2013.** Phenothiazines Inhibit Hepatitis C Virus Entry, Likely by Increasing the Fluidity of Cholesterol-Rich Membranes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 2571–2581. doi:10.1128/AAC.02593-12
- Chandler, D.E., Penin, F., Schulten, K., Chipot, C., 2012.** The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. *PLoS Comput Biol* 8, e1002702. doi:10.1371/journal.pcbi.1002702
- Chang, K.-S., Luo, G., 2006.** The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is required for efficient replication of hepatitis C virus (HCV) RNA. *Virus Res* 115, 1–8. doi:10.1016/j.virusres.2005.06.012
- Chang, L.-K., Wei, T.-T., Chiu, Y.-F., Tung, C.-P., Chuang, J.-Y., Hung, S.-K., Li, C., Liu, S.-T., 2003.** Inhibition of Epstein–Barr virus lytic cycle by (–)-epigallocatechin gallate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 1062–1068. doi:10.1016/S0006-291X(03)00067-6
- Chang, M., Williams, O., Mittler, J., Quintanilla, A., Carithers, R.L.J., Perkins, J., Corey, L., Gretch, D.R., 2003.** Dynamics of hepatitis C virus replication in human liver. *Am J Pathol* 163, 433–444. doi:10.1016/S0002-9440(10)63673-5
- Chen, C., Qiu, H., Gong, J., Liu, Q., Xiao, H., Chen, X.-W., Sun, B.-L., Yang, R.-G., 2012.** (–)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits the replication cycle of hepatitis C virus. *Archives of Virology* 157, 1301–1312. doi:10.1007/s00705-012-1304-0
- Chen, D., Wan, S.B., Yang, H., Yuan, J., Chan, T.H., Dou, Q.P., 2011.** EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. *Advances in clinical chemistry* 53, 155.
- Chen, J.-Y., Li, F., 2006.** Development of hepatitis C virus vaccine using hepatitis B core antigen as immuno-carrier. *World J Gastroenterol* 12, 7774–7778.
- Chen, L., Lee, M.J., Li, H., Yang, C.S., 1997.** Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos* 25, 1045–1050.
- Chen, L., Zhang, H.-Y., 2007.** Cancer Preventive Mechanisms of the Green Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin-3-gallate. *Molecules* 12, 946–957.
- Chen, M.-H., 2012.** Curcumin inhibits HCV replication by induction of heme oxygenase-1 and suppression of AKT. *International Journal of Molecular Medicine*. doi:10.3892/ijmm.2012.1096
- Chevaliez, S., Pawlotsky, J.-M., 2012.** Virology of hepatitis C virus infection. *Best Pract*

- Chin, Y.-W., Balunas, M.J., Chai, H.B., Kinghorn, A.D., 2006.** Drug discovery from natural sources. *The AAPS journal* 8, E239–E253.
- Chio, K.H., Phoon, M.C., Putti, T., Tan, B.K.H., Chow, V.T., 2016.** Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 9, 1–7. doi:10.1016/j.apjtm.2015.12.002
- Choo, Q.L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Van Nest, G., Han, J., Berger, K., Thudium, K., Kuo, C., 1994.** Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1294–1298.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M., 1989.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359–362.
- Chow, H.-H.S., Cai, Y., Hakim, I.A., Crowell, J.A., Shahi, F., Brooks, C.A., Dorr, R.T., Hara, Y., Alberts, D.S., 2003.** Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* 9, 3312–3319.
- Chowdhury, A., Sarkar, J., Chakraborti, T., Pramanik, P.K., Chakraborti, S., 2016.** Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 78, 50–59. doi:10.1016/j.biopha.2015.12.013
- Chu, K.O., Wang, C.C., Chu, C.Y., Chan, K.P., Rogers, M.S., Choy, K.W., Pang, C.P., 2006.** Pharmacokinetic studies of green tea catechins in maternal plasma and fetuses in rats. *J Pharm Sci* 95, 1372–1381. doi:10.1002/jps.20594
- Chung, J.E., Tan, S., Gao, S.J., Yongvongsoontorn, N., Kim, S.H., Lee, J.H., Choi, H.S., Yano, H., Zhuo, L., Kurisawa, M., Ying, J.Y., 2014.** Self-assembled micellar nanocomplexes comprising green tea catechin derivatives and protein drugs for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* 9, 907–912. doi:10.1038/nnano.2014.208
- Ciesek, S., von Hahn, T., Colpitts, C.C., Schang, L.M., Friesland, M., Steinmann, J., Manns, M.P., Ott, M., Wedemeyer, H., Meuleman, P., Pietschmann, T., Steinmann, E., 2011a.** The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* 54, 1947–1955. doi:10.1002/hep.24610
- Ciesek, S., Westhaus, S., Wicht, M., Wappler, I., Henschen, S., Sarrazin, C., Hamdi, N., Abdelaziz, A.I., Strassburg, C.P., Wedemeyer, H., Manns, M.P., Pietschmann, T., von Hahn, T., 2011b.** Impact of intra- and interspecies variation of occludin on its function as coreceptor for authentic hepatitis C virus particles. *J Virol* 85, 7613–7621. doi:10.1128/JVI.00212-11

- Cisowska, A., Wojnicz, D., Hendrich, A.B., 2011.** Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Nat Prod Commun* 6, 149–156.
- Clarke, D., Griffin, S., Beales, L., Gelais, C.S., Burgess, S., Harris, M., Rowlands, D., 2006.** Evidence for the Formation of a Heptameric Ion Channel Complex by the Hepatitis C Virus P7 Protein in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* 281, 37057–37068. doi:10.1074/jbc.M602434200
- Cleary, D.F.R., Oliveira, V., Gomes, N.C.M., Pereira, A., Henriques, I., Marques, B., Almeida, A., Cunha, A., Correia, A., Lillebo, A.I., 2012.** Impact of sampling depth and plant species on local environmental conditions, microbiological parameters and bacterial composition in a mercury contaminated salt marsh. *Mar Pollut Bull* 64, 263–271. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.11.020
- Clichici, S., Olteanu, D., Filip, A., Nagy, A.-L., Oros, A., Mircea, P.A., 2016.** Beneficial Effects of Silymarin After the Discontinuation of CCl₄-Induced Liver Fibrosis. *J Med Food* 19, 789–797. doi:10.1089/jmf.2015.0104
- Cocquerel, L., Op de Beeck, A., Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F., Dubuisson, J., 2002.** Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J* 21, 2893–2902. doi:10.1093/emboj/cdf295
- Cocquerel, L., Wychowski, C., Minner, F., Penin, F., Dubuisson, J., 2000.** Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *Journal of virology* 74, 3623–3633.
- Colin, C., Lanoir, D., Touzet, S., Meyaud-Kraemer, L., Bailly, F., Trepo, C., 2001.** Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat* 8, 87–95.
- Coller, K.E., Berger, K.L., Heaton, N.S., Cooper, J.D., Yoon, R., Randall, G., 2009.** RNA Interference and Single Particle Tracking Analysis of Hepatitis C Virus Endocytosis. *PLoS Pathogens* 5, e1000702. doi:10.1371/journal.ppat.1000702
- Colombatto, P., Brunetto, M.R., Maina, A.M., Romagnoli, V., Almasio, P., Rumi, M.G., Ascione, A., Pinzello, G., Mondelli, M., Muratori, L., Rappuoli, R., Rosa, D., Houghton, M., Abrignani, S., Bonino, F., 2014.** HCV E1E2-MF59 vaccine in chronic hepatitis C patients treated with PEG-IFNalpha2a and Ribavirin: a randomized controlled trial. *J Viral Hepat* 21, 458–465. doi:10.1111/jvh.12163
- Colpitts, C.C., Schang, L.M., 2014.** A Small Molecule Inhibits Virion Attachment to Heparan Sulfate- or Sialic Acid-Containing Glycans. *Journal of Virology* 88, 7806–7817. doi:10.1128/JVI.00896-14
- Colpitts, C.C., Ustinov, A.V., Epand, R.F., Epand, R.M., Korshun, V.A., Schang, L.M., 2013.** 5-(Perylen-3-yl)ethynyl-arabino-uridine (aUY11), an arabino-based rigid amphipathic fusion inhibitor, targets virion envelope lipids to inhibit fusion of

- influenza virus, hepatitis C virus, and other enveloped viruses. *J Virol* 87, 3640–3654. doi:10.1128/JVI.02882-12
- Cormier, E.G., Durso, R.J., Tsamis, F., Boussebart, L., Manix, C., Olson, W.C., Gardner, J.P., Dragic, T., 2004a.** L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14067–14072.
- Cormier, E.G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R.J., Gardner, J.P., Dragic, T., 2004b.** CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7270–7274.
- Counihan, N.A., Rawlinson, S.M., Lindenbach, B.D., 2011.** Trafficking of Hepatitis C Virus Core Protein during Virus Particle Assembly. *PLoS Pathogens* 7, e1002302. doi:10.1371/journal.ppat.1002302
- Couto, M.N.P.F.S., Basto, M.C.P., Vasconcelos, M.T.S.D., 2011.** Suitability of different salt marsh plants for petroleum hydrocarbons remediation. *Chemosphere* 84, 1052–1057. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.04.069
- Cox, A.L., Netski, D.M., Mosbrugger, T., Sherman, S.G., Strathdee, S., Ompad, D., Vlahov, D., Chien, D., Shyamala, V., Ray, S.C., others, 2005.** Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clinical Infectious Diseases* 40, 951–958.
- Cristofari, G., Ivanyi-Nagy, R., Gabus, C., Boulant, S., Lavergne, J.-P., Penin, F., 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. doi:10.1093/nar/gkh579
- Cui, Y., Oh, Y.J., Lim, J., Youn, M., Lee, I., Pak, H.K., Park, W., Jo, W., Park, S., 2012.** AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Food Microbiology* 29, 80–87. doi:10.1016/j.fm.2011.08.019
- Cuyper, L., Snoeck, J., Kerremans, L., Libin, P., Crabbe, R., Van Dooren, S., Vuagniaux, G., Vandamme, A.-M., 2016.** HCV1b genome evolution under selective pressure of the cyclophilin inhibitor alisporivir during the DEB-025-HCV-203 phase II clinical trial. *Infect Genet Evol* 44, 169–181. doi:10.1016/j.meegid.2016.06.050
- Czank, C., Cassidy, A., Zhang, Q., Morrison, D.J., Preston, T., Kroon, P.A., Botting, N.P., Kay, C.D., 2013.** Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a (13)C-tracer study. *Am J Clin Nutr* 97, 995–1003. doi:10.3945/ajcn.112.049247

D

- Dandri, M., 2001.** Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 33, 981–988. doi:10.1053/jhep.2001.23314
- Dane, D.S., Cameron, C.H., Briggs, M., 1970.** Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1, 695–698.
- Dao Thi, V.L., Dreux, M., Cosset, F.-L., 2011.** Scavenger receptor class B type I and the hypervariable region-1 of hepatitis C virus in cell entry and neutralisation. *Expert Rev Mol Med* 13, e13. doi:10.1017/S1462399411001785
- Datz, C., Cramp, M., Haas, T., Dietze, O., Nitschko, H., Froesner, G., Muss, N., Sandhofer, F., Vogel, W., 1999.** The natural course of hepatitis C virus infection 18 years after an epidemic outbreak of non-A, non-B hepatitis in a plasmapheresis centre. *Gut* 44, 563–567.
- Degre, D., Serste, T., Lasser, L., Delwaide, J., Starkel, P., Laleman, W., Langlet, P., Reynaert, H., Bourgeois, S., Vanwolleghem, T., Negrin Dastis, S., Gustot, T., Geerts, A., Van Steenkiste, C., de Galocsy, C., Lepida, A., Orlent, H., Moreno, C., 2017.** Sofosbuvir in Combination with Simeprevir +/- Ribavirin in Genotype 4 Hepatitis C Patients with Advanced Fibrosis or Cirrhosis: A Real-World Experience from Belgium. *PLoS One* 12, e0170933. doi:10.1371/journal.pone.0170933
- Desmet, V.J., Gerber, M., Hoofnagle, J.H., Manns, M., Scheuer, P.J., 1994.** Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 19, 1513–1520.
- Desombere, I., Fafi-Kremer, S., Van Houtte, F., Pessaux, P., Farhoudi, A., Heydmann, L., Verhoye, L., Cole, S., McKeating, J.A., Leroux-Roels, G., Baumert, T.F., Patel, A.H., Meuleman, P., 2016a.** Monoclonal anti-envelope antibody AP33 protects humanized mice against a patient-derived hepatitis C virus challenge. *Hepatology* 63, 1120–1134. doi:10.1002/hep.28428
- Deutsch, M., Papatheodoridis, G.V., 2010.** Danoprevir, a small-molecule NS3/4A protease inhibitor for the potential oral treatment of HCV infection. *Curr Opin Investig Drugs* 11, 951–963.
- Di Martino, V., 2001.** The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drug users: A long-term retrospective cohort study. *Hepatology* 34, 1193–1199. doi:10.1053/jhep.2001.29201
- Diao, J., Pantua, H., Ngu, H., Komuves, L., Diehl, L., Schaefer, G., Kapadia, S.B., 2012.** Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. *J Virol* 86, 10935–10949. doi:10.1128/JVI.00750-12

- Dienstag, J.L., 1983.** Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. *Gastroenterology* 85, 439–462.
- Domitrovich, A.M., Diebel, K.W., Ali, N., Sarker, S., Siddiqui, A., 2005.** Role of La autoantigen and polypyrimidine tract-binding protein in HCV replication. *Virology* 335, 72–86. doi:10.1016/j.virol.2005.02.009
- 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., Akira, S., Law, M., Rice, C.M., Ploss, A., 2013.** Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature* 501, 237–241. doi:10.1038/nature12427
- Dorner, M., Horwitz, J.A., Robbins, J.B., Barry, W.T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C.T., Schoggins, J.W., Catanese, M.T., Burton, D.R., Law, M., Rice, C.M., Ploss, A., 2011.** A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 474, 208–211. doi:10.1038/nature10168
- Douam, F., Dao Thi, V.L., Maurin, G., Fresquet, J., Mompelat, D., Zeisel, M.B., Baumert, T.F., Cosset, F.-L., Lavillette, D., 2014.** Critical interaction between E1 and E2 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell entry. *Hepatology* 59, 776–788.
- Drane, D., Maraskovsky, E., Gibson, R., Mitchell, S., Barnden, M., Moskwa, A., Shaw, D., Gervase, B., Coates, S., Houghton, M., Bassar, R., 2009.** Priming of CD4+ and CD8+ T cell responses using a HCV core ISCOMATRIX vaccine: a phase I study in healthy volunteers. *Hum Vaccin* 5, 151–157.
- D’Souza, R., Sabin, C.A., Foster, G.R., 2005.** Insulin Resistance Plays a Significant Role in Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C and in the Response to Antiviral Therapy. *The American Journal of Gastroenterology* 100, 1509–1515. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.41403.x
- Du, G.-J., Zhang, Z., Wen, X.-D., Yu, C., Calway, T., Yuan, C.-S., Wang, C.-Z., 2012.** Epigallocatechin Gallate (EGCG) Is the Most Effective Cancer Chemopreventive Polyphenol in Green Tea. *Nutrients* 4, 1679–1691. doi:10.3390/nu4111679
- Dubuisson, J., Hsu, H.H., Cheung, R.C., Greenberg, H.B., Russell, D.G., Rice, C.M., 1994.** Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *Journal of Virology* 68, 6147–6160.
- Dubuisson, J., Rice, C.M., 1996.** Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J Virol* 70, 778–786.
- Duffy, S., Shackelton, L.A., Holmes, E.C., 2008.** Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet* 9, 267–276. doi:10.1038/nrg2323

E

- EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection., 2014. . J Hepatol 60, 392–420. doi:10.1016/j.jhep.2013.11.003**
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., Bienz, K., 2002.** Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *Journal of Virology* 76, 5974–5984. doi:10.1128/JVI.76.12.5974-5984.2002
- Einav, S., Sklan, E.H., Moon, H.M., Gehrig, E., Liu, P., Hao, Y., Lowe, A.W., Glenn, J.S., 2008.** The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection. *Hepatology* 47, 827–835. doi:10.1002/hep.22108
- Elmowalid, G.A., Qiao, M., Jeong, S.-H., Borg, B.B., Baumert, T.F., Sapp, R.K., Hu, Z., Murthy, K., Liang, T.J., 2007.** Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8427–8432. doi:10.1073/pnas.0702162104
- El-Serag, H.B., Hampel, H., Yeh, C., Rabeneck, L., 2002.** Extrahepatic manifestations of hepatitis C among United States male veterans. *Hepatology* 36, 1439–1445.
- Eng, F.J., Walewski, J.L., Klepper, A.L., Fishman, S.L., Desai, S.M., McMullan, L.K., Evans, M.J., Rice, C.M., Branch, A.D., 2009.** Internal initiation stimulates production of p8 minicore, a member of a newly discovered family of hepatitis C virus core protein isoforms. *J Virol* 83, 3104–3114. doi:10.1128/JVI.01679-08
- Esser-Nobis, K., Romero-Brey, I., Ganten, T.M., Gouttenoire, J., Harak, C., Klein, R., Schemmer, P., Binder, M., Schnitzler, P., Moradpour, D., Bartenschlager, R., Polyak, S.J., Stremmel, W., Penin, F., Eisenbach, C., Lohmann, V., 2013.** Analysis of hepatitis C virus resistance to silibinin *in vitro* and *in vivo* points to a novel mechanism involving nonstructural protein 4B. *Hepatology* 57, 953–963. doi:10.1002/hep.26260
- Evans, M.J., Rice, C.M., Goff, S.P., 2004.** Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13038–13043.
- Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., Rice, C.M., 2007.** Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446, 801–805. doi:10.1038/nature05654

F

- Farhat, R., Goueslain, L., Wychowski, C., Belouzard, S., Fénéant, L., Jackson, C.L., Dubuisson, J., Rouillé, Y., 2013.** Hepatitis C Virus Replication and Golgi Function in Brefeldin A-Resistant Hepatoma-Derived Cells. *PLoS ONE* 8, e74491. doi:10.1371/journal.pone.0074491
- Farhat, R., Seron, K., Ferlin, J., Feneant, L., Belouzard, S., Goueslain, L., Jackson, C.L., Dubuisson, J., Rouille, Y., 2016.** Identification of class II ADP-ribosylation factors as cellular factors required for hepatitis C virus replication. *Cell Microbiol* 18, 1121–1133. doi:10.1111/cmi.12572
- Farquhar, M.J., Harris, H.J., McKeating, J.A., 2011.** Hepatitis C virus entry and the tetraspanin CD81. *Biochem Soc Trans* 39, 532–536. doi:10.1042/BST0390532
- Farquhar, M.J., Hu, K., Harris, H.J., Davis, C., Brimacombe, C.L., Fletcher, S.J., Baumert, T.F., Rappoport, J.Z., Balfe, P., McKeating, J.A., 2012.** Hepatitis C Virus Induces CD81 and Claudin-1 Endocytosis. *Journal of Virology* 86, 4305–4316. doi:10.1128/JVI.06996-11
- Fassina, G., Buffa, A., Benelli, R., Varnier, O.E., Noonan, D.M., Albini, A., 2002a.** Polyphenolic antioxidant (–)-epigallocatechin-3-gallate from green tea as a candidate anti-HIV agent. *Aids* 16, 939–941.
- Fattovich, G., Giustina, G., Degos, F., Tremolada, F., Diodati, G., Almasio, P., Nevens, F., Solinas, A., Mura, D., Brouwer, J.T., others, 1997.** Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 112, 463–472.
- Fauvelle, C., Felmlee, D.J., Crouchet, E., Lee, J., Heydmann, L., Lefevre, M., Magri, A., Hiet, M.-S., Fofana, I., Habersetzer, F., Fong, S.K.H., Milne, R., Patel, A.H., Vercauteren, K., Meuleman, P., Zeisel, M.B., Bartenschlager, R., Schuster, C., Baumert, T.F., 2016.** Apolipoprotein E Mediates Evasion From Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Gastroenterology* 150, 206–217.e4. doi:10.1053/j.gastro.2015.09.014
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J., Holland, P.V., 1975.** Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 292, 767–770. doi:10.1056/NEJM197504102921502
- Feld, J.J., Hoofnagle, J.H., 2005.** Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 436, 967–972. doi:10.1038/nature04082
- Fellay, J., Thompson, A.J., Ge, D., Gumbs, C.E., Urban, T.J., Shianna, K.V., Little, L.D., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Watson, M., Warner, A., Muir, A.J., Brass, C., Albrecht, J., Sulkowski, M., McHutchison, J.G., Goldstein, D.B., 2010.** ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature* 464, 405–408. doi:10.1038/nature08825

- Fénéant, L., Levy, S., Cocquerel, L., 2014.** CD81 and Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Viruses* 6, 535–572. doi:10.3390/v6020535
- Feng, Z.-H., Wang, Q.-C., Nie, Q.-H., Jia, Z.-S., Zhou, Y.-X., 2004.** DC-SIGN: binding receptor for HCV? *World J Gastroenterol* 10, 925–929.
- Ferenci, P., Beinhart, S., 2013.** Silibinin: An old drug in the high tech era of liver transplantation. *Journal of Hepatology* 58, 409–411. doi:10.1016/j.jhep.2012.11.030
- Ferenci, P., Scherzer, T., Kerschner, H., Rutter, K., Beinhart, S., Hofer, H., Schöniger-Hekele, M., Holzmann, H., Steindl-Munda, P., 2008.** Silibinin Is a Potent Antiviral Agent in Patients With Chronic Hepatitis C Not Responding to Pegylated Interferon/Ribavirin Therapy. *Gastroenterology* 135, 1561–1567. doi:10.1053/j.gastro.2008.07.072
- Ferraris, P., Blanchard, E., Roingeard, P., 2010.** Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *Journal of General Virology* 91, 2230–2237. doi:10.1099/vir.0.022186-0
- Ferron, F., Bussetta, C., Dutartre, H., Canard, B., 2005.** The modeled structure of the RNA dependent RNA polymerase of GBV-C virus suggests a role for motif E in Flaviviridae RNA polymerases. *BMC Bioinformatics* 6, 255. doi:10.1186/1471-2105-6-255
- Ferrucci, L.M., Bell, B.P., Dhotre, K.B., Manos, M.M., Terrault, N.A., Zaman, A., Murphy, R.C., VanNess, G.R., Thomas, A.R., Bialek, S.R., Desai, M.M., Sofair, A.N., 2010.** Complementary and Alternative Medicine Use in Chronic Liver Disease Patients: *Journal of Clinical Gastroenterology* 44, e40–e45. doi:10.1097/MCG.0b013e3181b766ed
- Firbas, C., Jilma, B., Tauber, E., Buerger, V., Jelovcan, S., Lingnau, K., Buschle, M., Frisch, J., Klade, C.S., 2006.** Immunogenicity and safety of a novel therapeutic hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine: a randomized, placebo controlled trial for dose optimization in 128 healthy subjects. *Vaccine* 24, 4343–4353. doi:10.1016/j.vaccine.2006.03.009
- Fishman, S.L., Factor, S.H., Balestrieri, C., Fan, X., DiBisceglie, A.M., Desai, S.M., Benson, G., Branch, A.D., 2009.** Mutations in the Hepatitis C Virus core Gene Are Associated with Advanced Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 15, 3205–3213. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2418
- Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L.D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S., McKeating, J.A., 1999.** Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *Journal of virology* 73, 6235–6244.
- Flint, M., von Hahn, T., Zhang, J., Farquhar, M., Jones, C.T., Balfe, P., Rice, C.M.,**

- McKeating, J.A., 2006.** Diverse CD81 Proteins Support Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* 80, 11331–11342. doi:10.1128/JVI.00104-06
- Flisiak, R., Feinman, S.V., Jablkowski, M., Horban, A., Kryczka, W., Pawlowska, M., Heathcote, J.E., Mazzella, G., Vandelli, C., Nicolas-Métral, V., Grosgrurin, P., Liz, J.S., Scalfaro, P., Porchet, H., Crabbé, R., 2009.** The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFN α 2a significantly reduces viral load in treatment-naïve hepatitis C patients. *Hepatology* 49, 1460–1468. doi:10.1002/hep.22835
- Fofana, I., Krieger, S.E., Grunert, F., Glaubens, S., Xiao, F., Fafi-Kremer, S., Soulier, E., Royer, C., Thumann, C., Mee, C.J., McKeating, J.A., Dragic, T., Pessaux, P., Stoll-Keller, F., Schuster, C., Thompson, J., Baumert, T.F., 2010.** Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology* 139, 953–964, 964–4. doi:10.1053/j.gastro.2010.05.073
- Folgore, A., Capone, S., Ruggeri, L., Meola, A., Sporeno, E., Ercole, B.B., Pezzanera, M., Tafi, R., Arcuri, M., Fattori, E., Lahm, A., Luzzago, A., Vitelli, A., Colloca, S., Cortese, R., Nicosia, A., 2006.** A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* 12, 190–197. doi:10.1038/nm1353
- Franco, S., Parera, M., Aparicio, E., Clotet, B., Martinez, M.A., 2007.** Genetic and catalytic efficiency structure of an HCV protease quasispecies. *Hepatology* 45, 899–910. doi:10.1002/hep.21623
- Frank, C., Mohamed, M.K., Strickland, G.T., Lavanchy, D., Arthur, R.R., Magder, L.S., El Khoby, T., Abdel-Wahab, Y., Anwar, W., Sallam, I., others, 2000.** The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *The Lancet* 355, 887–891.
- Frey, S.E., Houghton, M., Coates, S., Abrignani, S., Chien, D., Rosa, D., Pileri, P., Ray, R., Di Bisceglie, A.M., Rinella, P., Hill, H., Wolff, M.C., Schultze, V., Han, J.H., Scharschmidt, B., Belshe, R.B., 2010.** Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* 28, 6367–6373. doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.084
- Fridell, R.A., Wang, C., Sun, J.-H., O’Boyle, D.R., Nower, P., Valera, L., Qiu, D., Roberts, S., Huang, X., Kienzle, B., Bifano, M., Nettles, R.E., Gao, M., 2011.** Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor BMS-790052 in Humans: In Vitro and In Vivo Correlations. *Hepatology* 54, 1924–1935. doi:10.1002/hep.24594
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., Bartenschlager, R., 2001.** Sequences in the 5’ Nontranslated Region of Hepatitis C Virus Required for RNA Replication. *Journal of Virology* 75, 12047–12057. doi:10.1128/JVI.75.24.12047-12057.2001
- Fried, M.W., 2012.** Effect of Silymarin (Milk Thistle) on Liver Disease in Patients With Chronic Hepatitis C Unsuccessfully Treated With Interferon Therapy: A

Randomized Controlled Trial. *JAMA* 308, 274. doi:10.1001/jama.2012.8265

Fukazawa, H., Suzuki, T., Wakita, T., Murakami, Y., 2012. A cell-based, microplate colorimetric screen identifies 7,8-benzoflavone and green tea gallate catechins as inhibitors of the hepatitis C virus. *Biol Pharm Bull* 35, 1320–1327.

Furuse, M., Tsukita, S., 2006. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends in Cell Biology* 16, 181–188. doi:10.1016/j.tcb.2006.02.006

G

Galani, B.R.T., Sahuc, M.-E., Njayou, F.N., Deloison, G., Mkounga, P., Feudjou, W.F., Brodin, P., Rouillé, Y., Nkengfack, A.E., Moundipa, P.F., Séron, K., 2015. Plant extracts from Cameroonian medicinal plants strongly inhibit hepatitis C virus infection in vitro. *Frontiers in Microbiology* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00488

Galani, B.R.T., Sahuc, M.-E., Sass, G., Njayou, F.N., Loscher, C., Mkounga, P., Deloison, G., Brodin, P., Rouille, Y., Tiegs, G., Seron, K., Moundipa, P.F., 2016. *Khaya grandifoliola* C.DC: a potential source of active ingredients against hepatitis C virus in vitro. *Arch Virol* 161, 1169–1181. doi:10.1007/s00705-016-2771-5

Gal-Tanamy, M., Bachmetov, L., Ravid, A., Koren, R., Erman, A., Tur-Kaspa, R., Zemel, R., 2011. Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology* 54, 1570–1579. doi:10.1002/hep.24575

Gane, E.J., Stedman, C.A., Hyland, R.H., Ding, X., Svarovskaia, E., Symonds, W.T., Hindes, R.G., Berrey, M.M., 2013. Nucleotide Polymerase Inhibitor Sofosbuvir plus Ribavirin for Hepatitis C. *New England Journal of Medicine* 368, 34–44. doi:10.1056/NEJMoa1208953

Ganesan, S., Faris, A.N., Comstock, A.T., Wang, Q., Nanua, S., Hershenson, M.B., Sajjan, U.S., 2012. Quercetin inhibits rhinovirus replication in vitro and in vivo. *Antiviral Research* 94, 258–271. doi:10.1016/j.antiviral.2012.03.005

Gao, M., Nettles, R.E., Belema, M., Snyder, L.B., Nguyen, V.N., Fridell, R.A., Serrano-Wu, M.H., Langley, D.R., Sun, J.-H., O'Boyle II, D.R., Lemm, J.A., Wang, C., Knipe, J.O., Chien, C., Colonno, R.J., Grasela, D.M., Meanwell, N.A., Hamann, L.G., 2010. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 465, 96–100. doi:10.1038/nature08960

Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T., Olson, W.C., 2003. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 4498–4503.

Garrone, P., Fluckiger, A.-C., Mangeot, P.E., Gauthier, E., Dupeyrot-Lacas, P., Mancip,

- J., Cangialosi, A., Du Chene, I., LeGrand, R., Mangeot, I., Lavillette, D., Bellier, B., Cosset, F.-L., Tangy, F., Klatzmann, D., Dalba, C., 2011.** A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques. *Sci Transl Med* 3, 94ra71. doi:10.1126/scitranslmed.3002330
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., Chisari, F.V., 2008.** Cellular Determinants of Hepatitis C Virus Assembly, Maturation, Degradation, and Secretion. *Journal of Virology* 82, 2120–2129. doi:10.1128/JVI.02053-07
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., Sulkowski, M., McHutchison, J.G., Goldstein, D.B., 2009.** Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461, 399–401. doi:10.1038/nature08309
- Gentile, I., Zappulo, E., Buonomo, A.R., Maraolo, A.E., Borgia, G., 2015.** Beclabuvir for the treatment of hepatitis C. *Expert Opin Investig Drugs* 24, 1111–1121. doi:10.1517/13543784.2015.1059820
- Gil, R., Bautista, I., Boscaiu, M., Lidon, A., Wankhade, S., Sanchez, H., Llinares, J., Vicente, O., 2014.** Responses of five Mediterranean halophytes to seasonal changes in environmental conditions. *AoB PLANTS* 6, plu049-plu049. doi:10.1093/aobpla/plu049
- Gitnick, G., 1998.** Hepatitis C: controversies, strategies and challenges. *European Journal of Surgery* 164, 65–70.
- Gocke, D.J., 1972.** A prospective study of posttransfusion hepatitis. The role of Australia Antigen. *JAMA* 219, 1165–1170.
- Goldwasser, J., Cohen, P.Y., Lin, W., Kitsberg, D., Balaguer, P., Polyak, S.J., Chung, R.T., Yarmush, M.L., Nahmias, Y., 2011.** Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism. *Journal of Hepatology* 55, 963–971. doi:10.1016/j.jhep.2011.02.011
- Gomez-Rubio, M., Porres, J.C., Castillo, I., Quiroga, J.A., Moreno, A., Carreno, V., 1990.** Prolonged treatment (18 months) of chronic hepatitis C with recombinant alpha-interferon in comparison with a control group. *J Hepatol* 11 Suppl 1, S63-67.
- Gonzalez, O., Fontanes, V., Raychaudhuri, S., Loo, R., Loo, J., Arumugaswami, V., Sun, R., Dasgupta, A., French, S.W., 2009.** The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology* 50, 1756–1764. doi:10.1002/hep.23232
- Gonzalez-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W., Crozier, A., 2010.** Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *J Agric Food Chem* 58, 3933–3939.

doi:10.1021/jf100315d

- Gonzalez-Candelas, F., López-Labrador, F.X., Bracho, M.A., 2011.** Recombination in Hepatitis C Virus. *Viruses* 3, 2006–2024. doi:10.3390/v3102006
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K., Moradpour, D., 2003.** Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *Journal of Virology* 77, 5487–5492. doi:10.1128/JVI.77.9.5487-5492.2003
- Gottwein, J.M., Jensen, T.B., Mathiesen, C.K., Meuleman, P., Serre, S.B.N., Lademann, J.B., Ghanem, L., Scheel, T.K.H., Leroux-Roels, G., Bukh, J., 2011.** Development and Application of Hepatitis C Reporter Viruses with Genotype 1 to 7 Core-Nonstructural Protein 2 (NS2) Expressing Fluorescent Proteins or Luciferase in Modified JFH1 NS5A. *Journal of Virology* 85, 8913–8928. doi:10.1128/JVI.00049-11
- Goueslain, L., Alsaleh, K., Horellou, P., Roingeard, P., Descamps, V., Duverlie, G., Ciczora, Y., Wychowski, C., Dubuisson, J., Rouille, Y., 2010.** Identification of GBF1 as a Cellular Factor Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology* 84, 773–787. doi:10.1128/JVI.01190-09
- Gouttenoire, J., Castet, V., Montserret, R., Arora, N., Raussens, V., Ruyschaert, J.-M., Diesis, E., Blum, H.E., Penin, F., Moradpour, D., 2009a.** Identification of a Novel Determinant for Membrane Association in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. *Journal of Virology* 83, 6257–6268. doi:10.1128/JVI.02663-08
- Gouttenoire, J., Montserret, R., Kennel, A., Penin, F., Moradpour, D., 2009b.** An Amphipathic α -Helix at the C Terminus of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Mediates Membrane Association. *Journal of Virology* 83, 11378–11384. doi:10.1128/JVI.01122-09
- Gouttenoire, J., Penin, F., Moradpour, D., 2010.** Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Reviews in Medical Virology* 20, 117–129. doi:10.1002/rmv.640
- Gouttenoire, J., Roingeard, P., Penin, F., Moradpour, D., 2010.** Amphipathic α -helix AH2 is a major determinant for the oligomerization of hepatitis C virus nonstructural protein 4B. *J Virol* 84, 12529–12537. doi:10.1128/JVI.01798-10
- Graham, H.N., 1992.** Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21, 334–350.
- Grebely, J., Page, K., Sacks-Davis, R., Loeff, M.S., Rice, T.M., Bruneau, J., Morris, M.D., Hajarizadeh, B., Amin, J., Cox, A.L., others, 2014.** The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* 59, 109–120.
- Grüner, N.H., Gerlach, T.J., Jung, M.-C., Diepolder, H.M., Schirren, C.A., Schraut,**

W.W., Hoffmann, R., Zchoval, R., Santantonio, T., Cucchiarini, M., others, 2000. Association of Hepatitis C Virus—Specific CD8+ T Cells with Viral Clearance in Acute Hepatitis C. *Journal of Infectious Diseases* 181, 1528–1536.

Guedj, J., Dahari, H., Uprichard, S.L., Perelson, A.S., 2013. The hepatitis C virus NS5A inhibitor daclatasvir has a dual mode of action and leads to a new virus half-life estimate. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 7, 397–399. doi:10.1586/17474124.2013.811050

Guo, K., Liang, Z., Liu, L., Li, F., Wang, H., 2016. Flavonoids intake and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Andrologia*. doi:10.1111/and.12556

H

Habersetzer, F., Honnet, G., Bain, C., Maynard-Muet, M., Leroy, V., Zarski, J.-P., Feray, C., Baumert, T.F., Bronowicki, J.-P., Doffoel, M., Trepo, C., Agathon, D., Toh, M.-L., Baudin, M., Bonnefoy, J.-Y., Limacher, J.-M., Inchauspe, G., 2011. A poxvirus vaccine is safe, induces T-cell responses, and decreases viral load in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 141, 890–899–4. doi:10.1053/j.gastro.2011.06.009

Hagiwara, S., Nishida, N., Watanabe, T., Sakurai, T., Ida, H., Minami, Y., Takita, M., Minami, T., Iwanishi, M., Chishina, H., Ueshima, K., Komeda, Y., Arizumi, T., Kudo, M., 2016. Outcome of Asunaprevir/Daclatasvir Combination Therapy for Chronic Liver Disease Type C. *Dig Dis* 34, 620–626. doi:10.1159/000448822

Hajarizadeh, B., Grebely, J., Dore, G.J., 2013. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 10, 553–562. doi:10.1038/nrgastro.2013.107

Halegoua-De Marzio, D., Kraft, W.K., Daskalakis, C., Ying, X., Hawke, R.L., Navarro, V.J., 2012. Limited Sampling Estimates of Epigallocatechin Gallate Exposures in Cirrhotic and Noncirrhotic Patients With Hepatitis C After Single Oral Doses of Green Tea Extract. *Clinical Therapeutics* 34, 2279–2285.e1. doi:10.1016/j.clinthera.2012.10.009

Hamza, A., Zhan, C.-G., 2006. How Can (–)-Epigallocatechin Gallate from Green Tea Prevent HIV-1 Infection? Mechanistic Insights from Computational Modeling and the Implication for Rational Design of Anti-HIV-1 Entry Inhibitors. *The Journal of Physical Chemistry B* 110, 2910–2917. doi:10.1021/jp0550762

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Haneda, E., Furuya, T., Asai, S., Morikawa, Y., Ohtsuki, K., 2000. Biochemical

Characterization of Casein Kinase II as a Protein Kinase Responsible for Stimulation of HIV-1 Protease in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275, 434–439. doi:10.1006/bbrc.2000.3319

Hanouille, X., Badillo, A., Wieruszeski, J.-M., Verdegem, D., Landrieu, I., Bartenschlager, R., Penin, F., Lippens, G., 2009. Hepatitis C Virus NS5A Protein Is a Substrate for the Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerase Activity of Cyclophilins A and B. *Journal of Biological Chemistry* 284, 13589–13601. doi:10.1074/jbc.M809244200

Hanouille, X., Verdegem, D., Badillo, A., Wieruszeski, J.-M., Penin, F., Lippens, G., 2009. Domain 3 of non-structural protein 5A from hepatitis C virus is natively unfolded. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381, 634–638. doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.108

Harada, S., Haneda, E., Maekawa, T., Morikawa, Y., Funayama, S., Nagata, N., Ohtsuki, K., Nagata, N., Ohtsuki, K., 1999. Casein kinase II (CK-II)-mediated stimulation of HIV-1 reverse transcriptase activity and characterization of selective inhibitors in vitro. *Biol Pharm Bull* 22, 1122–1126.

Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.

Harris, H.J., Farquhar, M.J., Mee, C.J., Davis, C., Reynolds, G.M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S.G., Han, J.H., Balfe, P., McKeating, J.A., 2008. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* 82, 5007–5020. doi:10.1128/JVI.02286-07

Hartjen, P., Frerk, S., Hauber, I., Matzat, V., Thomssen, A., Holstermann, B., Hohenberg, H., Schulze, W., zur Wiesch, J.S., van Lunzen, J., 2012. Assessment of the range of the HIV-1 infectivity enhancing effect of individual human semen specimen and the range of inhibition by EGCG. *AIDS research and therapy* 9, 1.

Hauber, I., Hohenberg, H., Holstermann, B., Hunstein, W., Hauber, J., 2009. The main green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate counteracts semen-mediated enhancement of HIV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 9033–9038.

Hawke, R.L., Schrieber, S.J., Soule, T.A., Wen, Z., Smith, P.C., Reddy, K.R., Wahed, A.S., Belle, S.H., Afdhal, N.H., Navarro, V.J., Berman, J., Liu, Q.-Y., Doo, E., Fried, M.W., The SyNCH Trial Group, 2010. Silymarin Ascending Multiple Oral Dosing Phase I Study in Noncirrhotic Patients With Chronic Hepatitis C. *The Journal of Clinical Pharmacology* 50, 434–449. doi:10.1177/0091270009347475

Haydon, G.H., Jarvis, L.M., Blair, C.S., Simmonds, P., Harrison, D.J., Simpson, K.J., Hayes, P.C., 1998. Clinical significance of intrahepatic hepatitis C virus levels in patients with chronic HCV infection. *Gut* 42, 570–575.

He, J., Giusti, M.M., 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting

- properties. *Annu Rev Food Sci Technol* 1, 163–187. doi:10.1146/annurev.food.080708.100754
- He, J., Wallace, T.C., Keatley, K.E., Failla, M.L., Giusti, M.M., 2009.** Stability of black raspberry anthocyanins in the digestive tract lumen and transport efficiency into gastric and small intestinal tissues in the rat. *J Agric Food Chem* 57, 3141–3148. doi:10.1021/jf900567t
- He, L., Zhang, E., Shi, J., Li, X., Zhou, K., Zhang, Q., Le, A.D., Tang, X., 2013.** (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits human papillomavirus (HPV)-16 oncoprotein-induced angiogenesis in non-small cell lung cancer cells by targeting HIF-1 α . *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 71, 713–725. doi:10.1007/s00280-012-2063-z
- He, W., 2011.** Epigallocatechin gallate inhibits HBV DNA synthesis in a viral replication - inducible cell line. *World Journal of Gastroenterology* 17, 1507. doi:10.3748/wjg.v17.i11.1507
- Helle, F., Goffard, A., Morel, V., Duverlie, G., McKeating, J., Keck, Z.-Y., Fong, S., Penin, F., Dubuisson, J., Voisset, C., 2007.** The Neutralizing Activity of Anti-Hepatitis C Virus Antibodies Is Modulated by Specific Glycans on the E2 Envelope Protein. *Journal of Virology* 81, 8101–8111. doi:10.1128/JVI.00127-07
- Helle, F., Vieyres, G., Elkrief, L., Popescu, C.-I., Wychowski, C., Descamps, V., Castelain, S., Roingeard, P., Duverlie, G., Dubuisson, J., 2010.** Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol* 84, 11905–11915. doi:10.1128/JVI.01548-10
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A.R., Farese, R.V., Ott, M., 2010.** Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nature Medicine* 16, 1295–1298. doi:10.1038/nm.2238
- Hernandez-Gea, V., Friedman, S.L., 2011.** Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 6, 425–456. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130246
- Herod, M.R., Jones, D.M., McLauchlan, J., McCormick, C.J., 2012.** Increasing rate of cleavage at boundary between non-structural proteins 4B and 5A inhibits replication of hepatitis C virus. *J Biol Chem* 287, 568–580. doi:10.1074/jbc.M111.311407
- Herrmann, E., 2003.** Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. *Hepatology* 37, 1351–1358. doi:10.1053/jhep.2003.50218
- Hewitt, K.J., Agarwal, R., Morin, P.J., 2006.** The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 6, 186. doi:10.1186/1471-2407-6-186

- Hézode, C., Fontaine, H., Dorival, C., Larrey, D., Zoulim, F., Canva, V., de Ledinghen, V., Poynard, T., Samuel, D., Bourlière, M., others, 2013.** Triple therapy in treatment-experienced patients with HCV-cirrhosis in a multicentre cohort of the French Early Access Programme (ANRS CO20-CUPIC)–NCT01514890. *Journal of hepatology* 59, 434–441.
- Hidalgo, J., Flores, C., Hidalgo, M.A., Perez, M., Yañez, A., Quiñones, L., Caceres, D.D., Burgos, R.A., 2014.** Delphinol® standardized maqui berry extract reduces postprandial blood glucose increase in individuals with impaired glucose regulation by novel mechanism of sodium glucose cotransporter inhibition. *Panminerva Med* 56, 1–7.
- Honda, M., Beard, M.R., Ping, L.-H., Lemon, S.M., 1999.** A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *Journal of virology* 73, 1165–1174.
- Honda, M., Brown, E.A., Lemon, S.M., 1996.** Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* 2, 955–968.
- Hoofnagle, J.H., Mullen, K.D., Jones, D.B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Wagoner, J.G., Park, Y., Jones, E.A., 1986.** Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* 315, 1575–1578. doi:10.1056/NEJM198612183152503
- Horner, S.M., Liu, H.M., Park, H.S., Briley, J., Gale, M.J., 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. doi:10.1073/pnas.1110133108
- Hu, K.-Q., Tong, M.J., 1999.** The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the united states. *Hepatology* 29, 1311–1316.
- Huang, H.-C., Tao, M.-H., Hung, T.-M., Chen, J.-C., Lin, Z.-J., Huang, C., 2014.** (–)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Antiviral Research* 111, 100–111. doi:10.1016/j.antiviral.2014.09.009
- Huang, L., Hwang, J., Sharma, S.D., Hargittai, M.R.S., Chen, Y., Arnold, J.J., Raney, K.D., Cameron, C.E., 2005.** Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* 280, 36417–36428. doi:10.1074/jbc.M508175200
- Huang, S.-D., Zhang, Y., Cao, M.-M., Di, Y.-T., Tang, G.-H., Peng, Z.-G., Jiang, J.-D., He, H.-P., Hao, X.-J., 2013.** Myriberine A, a new alkaloid with an unprecedented heteropentacyclic skeleton from *Myrioneuron faberi*. *Org Lett* 15, 590–593. doi:10.1021/ol3034065

Hwang, J., Huang, L., Cordek, D.G., Vaughan, R., Reynolds, S.L., Kihara, G., Raney, K.D., Kao, C.C., Cameron, C.E., 2010. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A: Biochemical Characterization of a Novel Structural Class of RNA-Binding Proteins. *Journal of Virology* 84, 12480–12491. doi:10.1128/JVI.01319-10

I

Ip, P.P., Nijman, H.W., Wilschut, J., Daemen, T., 2012. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis C virus infection. *Antiviral Research* 96, 36–50. doi:10.1016/j.antiviral.2012.07.006

Isaacs, C.E., Wen, G.Y., Xu, W., Jia, J.H., Rohan, L., Corbo, C., Di Maggio, V., Jenkins, E.C., Hillier, S., 2008. Epigallocatechin Gallate Inactivates Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 962–970. doi:10.1128/AAC.00825-07

Isaacs, C.E., Xu, W., Merz, G., Hillier, S., Rohan, L., Wen, G.Y., 2011. Digallate Dimers of (-)-Epigallocatechin Gallate Inactivate Herpes Simplex Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 5646–5653. doi:10.1128/AAC.05531-11

Ishiuchi, K., 'ichiro, Kosuge, Y., Hamagami, H., Ozaki, M., Ishige, K., Ito, Y., Kitanaka, S., 2015a. Chemical constituents isolated from *Juncus effusus* induce cytotoxicity in HT22 cells. *J Nat Med* 69, 421–426. doi:10.1007/s11418-015-0898-4

J

Jacobson, I.M., Dore, G.J., Foster, G.R., Fried, M.W., Radu, M., Rafalsky, V.V., Moroz, L., Craxi, A., Peeters, M., Lenz, O., Ouwerkerk-Mahadevan, S., De La Rosa, G., Kalmeijer, R., Scott, J., Sinha, R., Beumont-Mauviel, M., 2014. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 384, 403–413. doi:10.1016/S0140-6736(14)60494-3

Jacobson, I.M., McHutchison, J.G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A.M., Reddy, K.R., Bzowej, N.H., Marcellin, P., Muir, A.J., Ferenci, P., Flisiak, R., George, J., Rizzetto, M., Shouval, D., Sola, R., Terg, R.A., Yoshida, E.M., Adda, N., Bengtsson, L., Sankoh, A.J., Kieffer, T.L., George, S., Kauffman, R.S., Zeuzem, S., 2011. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 364, 2405–2416. doi:10.1056/NEJMoa1012912

Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., Persson, R., King, B.D.,

- Kauppinen, S., Levin, A.A., Hodges, M.R., 2013.** Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *New England Journal of Medicine* 368, 1685–1694. doi:10.1056/NEJMoa1209026
- Jardim, A.C.G., Igloi, Z., Shimizu, J.F., Santos, V.A.F.F.M., Felipe, L.G., Mazzeu, B.F., Amako, Y., Furlan, M., Harris, M., Rahal, P., 2015.** Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. *Antiviral Research* 115, 39–47. doi:10.1016/j.antiviral.2014.12.018
- Jeon, J., Kim, J.H., Lee, C.K., Oh, C.H., Song, H.J., 2014.** The Antimicrobial Activity of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate and Green Tea Extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Isolated from Skin Wounds. *Annals of Dermatology* 26, 564. doi:10.5021/ad.2014.26.5.564
- Jeong, M.-H., Ko, H., Jeon, H., Sung, G.-J., Park, S.-Y., Jun, W.J., Lee, Y.-H., Lee, J., Lee, S.-W., Yoon, H.-G., Choi, K.-C., 2016.** Delphinidin induces apoptosis via cleaved HDAC3-mediated p53 acetylation and oligomerization in prostate cancer cells. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.10790
- Jiang, J., Cun, W., Wu, X., Shi, Q., Tang, H., Luo, G., 2012.** Hepatitis C Virus Attachment Mediated by Apolipoprotein E Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology* 86, 7256–7267. doi:10.1128/JVI.07222-11
- Jiang, J., Wu, X., Tang, H., Luo, G., 2013.** Apolipoprotein E mediates attachment of clinical hepatitis C virus to hepatocytes by binding to cell surface heparan sulfate proteoglycan receptors. *PLoS One* 8, e67982. doi:10.1371/journal.pone.0067982
- Jilg, W., 1993.** Adult use of hepatitis A vaccine in developed countries. *Vaccine* 11 Suppl 1, S6-8.
- Jin, F., Matthews, G.V., Grulich, A.E., 2016.** Sexual transmission of hepatitis C virus among gay and bisexual men: a systematic review. *Sex Health*. doi:10.1071/SH16141
- Jirasko, V., Montserret, R., Appel, N., Janvier, A., Eustachi, L., Brohm, C., Steinmann, E., Pietschmann, T., Penin, F., Bartenschlager, R., 2008.** Structural and Functional Characterization of Nonstructural Protein 2 for Its Role in Hepatitis C Virus Assembly. *Journal of Biological Chemistry* 283, 28546–28562. doi:10.1074/jbc.M803981200
- Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J.Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F., Bartenschlager, R., 2010.** Structural and Functional Studies of Nonstructural Protein 2 of the Hepatitis C Virus Reveal Its Key Role as Organizer of Virion Assembly. *PLoS Pathogens* 6, e1001233. doi:10.1371/journal.ppat.1001233
- Jones, D.M., Patel, A.H., Targett-Adams, P., McLauchlan, J., 2009.** The Hepatitis C Virus NS4B Protein Can trans-Complement Viral RNA Replication and Modulates Production of Infectious Virus. *Journal of Virology* 83, 2163–2177. doi:10.1128/JVI.01885-08

Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., Sarnow, P., 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577–1581. doi:10.1126/science.1113329

K

Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S., Kohara, M., 1994. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *Journal of General Virology* 75, 1755–1760.

Kao, C.C., Yi, G., Huang, H.-C., 2016. The core of hepatitis C virus pathogenesis. *Curr Opin Virol* 17, 66–73. doi:10.1016/j.coviro.2016.01.009

Kapadia, S.B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J.A., Chisari, F.V., 2007. Initiation of Hepatitis C Virus Infection Is Dependent on Cholesterol and Cooperativity between CD81 and Scavenger Receptor B Type I. *Journal of Virology* 81, 374–383. doi:10.1128/JVI.01134-06

Karamitros, T., Kakkanas, A., Katsoulidou, A., Sypsa, V., Dalagiorgou, G., Mavromara, P., Hatzakis, A., 2012. Detection of specific antibodies to HCV-ARF/CORE+1 protein in patients treated with pegylated interferon plus ribavirin: ANTI-ARF/CORE+1 antibodies in HCV patients. *Journal of Viral Hepatitis* 19, 182–188. doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01502.x

Kardonob, L.B., Shimizu, Y., Sudarmono, P., Hotta, H., 2015. Isolation and identification of substances with anti-hepatitisC virus activities from *Kalanchoe Pinnata*. *diabetes* 4, 5.

Kataoka, H., Ohe, T., Takahashi, K., Nakamura, S., Mashino, T., 2016. Novel fullerene derivatives as dual inhibitors of Hepatitis C virus NS5B polymerase and NS3/4A protease. *Bioorg Med Chem Lett* 26, 4565–4567. doi:10.1016/j.bmcl.2016.08.086

Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas Lopez, M., Lohmann, V., Luban, J., Bartenschlager, R., 2009. Essential Role of Cyclophilin A for Hepatitis C Virus Replication and Virus Production and Possible Link to Polyprotein Cleavage Kinetics. *PLoS Pathogens* 5, e1000546. doi:10.1371/journal.ppat.1000546

Kawai, K., Tsuno, N.H., Kitayama, J., Okaji, Y., Yazawa, K., Asakage, M., Hori, N., Watanabe, T., Takahashi, K., Nagawa, H., 2003. Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. *Journal of allergy and clinical immunology* 112, 951–957.

Kay, C.D., Mazza, G.J., Holub, B.J., 2005. Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *The Journal of nutrition* 135, 2582–2588.

- Kenny-Walsh, E., 1999.** Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med* 340, 1228–1233. doi:10.1056/NEJM199904223401602
- Kenny-Walsh, E., 1999.** Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *New England Journal of Medicine* 340, 1228–1233.
- Keravis, T., Favot, L., Abusnina, A.A., Anton, A., Justiniano, H., Soleti, R., Alabed Alibrahim, E., Simard, G., Andriantsitohaina, R., Lugnier, C., 2015.** Delphinidin Inhibits Tumor Growth by Acting on VEGF Signalling in Endothelial Cells. *PLoS One* 10, e0145291. doi:10.1371/journal.pone.0145291
- Khachatoorian, R., Arumugaswami, V., Raychaudhuri, S., Yeh, G.K., Maloney, E.M., Wang, J., Dasgupta, A., French, S.W., 2012.** Divergent antiviral effects of bioflavonoids on the hepatitis C virus life cycle. *Virology* 433, 346–355. doi:10.1016/j.virol.2012.08.029
- Khan, A.G., Whidby, J., Miller, M.T., Scarborough, H., Zatorski, A.V., Cygan, A., Price, A.A., Yost, S.A., Bohannon, C.D., Jacob, J., Grakoui, A., Marcotrigiano, J., 2014.** Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature* 509, 381–384. doi:10.1038/nature13117
- Kim, H.-S., Sul, D., Lim, J.-Y., Lee, D., Joo, S.S., Hwang, K.W., Park, S.-Y., 2009.** Delphinidin ameliorates beta-amyloid-induced neurotoxicity by inhibiting calcium influx and tau hyperphosphorylation. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 1685–1689. doi:10.1271/bbb.90032
- Kim, M., Kim, S.-Y., Lee, H.W., Shin, J.S., Kim, P., Jung, Y.-S., Jeong, H.-S., Hyun, J.-K., Lee, C.-K., 2013.** Inhibition of influenza virus internalization by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Antiviral Research* 100, 460–472. doi:10.1016/j.antiviral.2013.08.002
- King, R.W., Zecher, M., Jeffries, M.W., Carroll, D.R., Parisi, J.M., Pasquinelli, C., 2002.** A cell-based model of HCV-negative-strand RNA replication utilizing a chimeric hepatitis C virus/reporter RNA template. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 13, 353–362.
- Kirby, B.J., Symonds, W.T., Kearney, B.P., Mathias, A.A., 2015.** Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Drug-Interaction Profile of the Hepatitis C Virus NS5B Polymerase Inhibitor Sofosbuvir. *Clin Pharmacokinet* 54, 677–690. doi:10.1007/s40262-015-0261-7
- Klade, C.S., Wedemeyer, H., Berg, T., Hinrichsen, H., Cholewinska, G., Zeuzem, S., Blum, H., Buschle, M., Jelovcan, S., Buerger, V., Tauber, E., Frisch, J., Manns, M.P., 2008.** Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. *Gastroenterology* 134, 1385–1395. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.058

- Kohlway, A., Pirakitikulr, N., Barrera, F.N., Potapova, O., Engelman, D.M., Pyle, A.M., Lindenbach, B.D., 2014.** Hepatitis C virus RNA replication and virus particle assembly require specific dimerization of the NS4A protein transmembrane domain. *J Virol* 88, 628–642. doi:10.1128/JVI.02052-13
- Koklu, S., Koksak, I., Akarca, U.S., Balkan, A., Guner, R., Demirezen, A., Sahin, M., Akhan, S., Ozaras, R., Idilman, R., 2017.** Daclatasvir plus asunaprevir dual therapy for chronic HCV genotype 1b infection: results of Turkish early access program. *Ann Hepatol* 16, 71–76. doi:10.5604/16652681.1226817
- Kolykhalov, A.A., Agapov, E.V., Blight, K.J., Mihalik, K., Feinstone, S.M., Rice, C.M., 1997.** Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 277, 570–574.
- Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., Rusak, G., Likić, S., Berendika, M., 2011.** Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. *Phytochemical Analysis* 22, 172–180. doi:10.1002/pca.1264
- Kong, L., Giang, E., Nieusma, T., Kadam, R.U., Cogburn, K.E., Hua, Y., Dai, X., Stanfield, R.L., Burton, D.R., Ward, A.B., Wilson, I.A., Law, M., 2013.** Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Core Structure. *Science* 342, 1090–1094. doi:10.1126/science.1243876
- Kotta-Loizou, I., Vassilaki, N., Pissas, G., Kakkanas, A., Bakiri, L., Bartenschlager, R., Mavromara, P., 2013.** Hepatitis C virus core+1/ARF protein decreases hepcidin transcription through an AP1 binding site. *Journal of General Virology* 94, 1528–1534. doi:10.1099/vir.0.050328-0
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T., Bartenschlager, R., 2006.** Characterization of the Early Steps of Hepatitis C Virus Infection by Using Luciferase Reporter Viruses. *Journal of Virology* 80, 5308–5320. doi:10.1128/JVI.02460-05
- Krey, T., d'Alayer, J., Kikuti, C.M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, I., Johansson, D.X., Tawar, R.G., Baron, B., Robert, B., England, P., Persson, M.A.A., Martin, A., Rey, F.A., 2010.** The Disulfide Bonds in Glycoprotein E2 of Hepatitis C Virus Reveal the Tertiary Organization of the Molecule. *PLoS Pathogens* 6, e1000762. doi:10.1371/journal.ppat.1000762
- Krishnan, P., Beyer, J., Mistry, N., Koev, G., Reisch, T., DeGoey, D., Kati, W., Campbell, A., Williams, L., Xie, W., Setze, C., Molla, A., Collins, C., Pilot-Matias, T., 2015.** In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of ombitasvir, an inhibitor of hepatitis C virus NS5A. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 979–987. doi:10.1128/AAC.04226-14
- Kroll, D.J., Shaw, H.S., Oberlies, N.H., 2007.** Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies. *Integr Cancer Ther* 6, 110–119. doi:10.1177/1534735407301825

Krugman, S., Giles, J.P., Hammond, J., 1967. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* 200, 365–373.

Ksouri, H., Balanant, P.-Y., Tadie, J.-M., Heraud, G., Abboud, I., Lerolle, N., Novara, A., Fagon, J.-Y., Faisy, C., 2010. Impact of morbidity and mortality conferences on analysis of mortality and critical events in intensive care practice. *Am J Crit Care* 19, 135–145; quiz 146. doi:10.4037/ajcc2010590

Ksouri, H., Mellouli, F., Bejaoui, M., 2008. [Antiphospholipid syndrome: pathophysiology and clinicobiological aspects]. *Arch Inst Pasteur Tunis* 85, 91–105.

Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C., 2008. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C R Biol* 331, 865–873. doi:10.1016/j.crvi.2008.07.024

Kumada, H., Mochida, S., Suzuki, F., Chayama, K., Karino, Y., Nakamura, K., Fujimoto, G., Howe, A.Y.M., Ludmerer, S.W., Mobashery, N., 2016. Vaniprevir plus peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-experienced Japanese patients with hepatitis C virus genotype 1 (GT1b) infection: Phase 3 studies. *J Gastroenterol Hepatol* 31, 1674–1683. doi:10.1111/jgh.13328

Kumthip, K., Maneekarn, N., 2015. The role of HCV proteins on treatment outcomes. *Virol J* 12, 217. doi:10.1186/s12985-015-0450-x

Kushima, Y., Wakita, T., Hijikata, M., 2010. A Disulfide-Bonded Dimer of the Core Protein of Hepatitis C Virus Is Important for Virus-Like Particle Production. *Journal of Virology* 84, 9118–9127. doi:10.1128/JVI.00402-10

L

Lacek, K., Vercauteren, K., Grzyb, K., Naddeo, M., Verhoye, L., Slowikowski, M.P., Fafi-Kremer, S., Patel, A.H., Baumert, T.F., Folgari, A., Leroux-Roels, G., Cortese, R., Meuleman, P., Nicosia, A., 2012. Novel human SR-BI antibodies prevent infection and dissemination of HCV in vitro and in humanized mice. *J Hepatol* 57, 17–23. doi:10.1016/j.jhep.2012.02.018

Lam, A.M., Espiritu, C., Bansal, S., Micolochick Steuer, H.M., Niu, C., Zennou, V., Keilman, M., Zhu, Y., Lan, S., Otto, M.J., Furman, P.A., 2012. Genotype and subtype profiling of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 3359–3368. doi:10.1128/AAC.00054-12

Lamarre, D., Anderson, P.C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P., Bos, M., Cameron, D.R., Cartier, M., Cordingley, M.G., Faucher, A.-M., Goudreau, N.,

- Kawai, S.H., Kukolj, G., Lagace, L., LaPlante, S.R., Narjes, H., Poupart, M.-A., Rancourt, J., Sentjens, R.E., St George, R., Simoneau, B., Steinmann, G., Thibeault, D., Tsantrizos, Y.S., Weldon, S.M., Yong, C.-L., Llinas-Brunet, M., 2003.** An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426, 186–189. doi:10.1038/nature02099
- Lan, K.-H., Wang, Y.-W., Lee, W.-P., Lan, K.-L., Tseng, S.-H., Hung, L.-R., Yen, S.-H., Lin, H.-C., Lee, S.-D., 2012.** Multiple effects of honokiol on the life cycle of hepatitis C virus. *Liver International* 32, 989–997. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02621.x
- Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., Orum, H., 2010.** Therapeutic Silencing of MicroRNA-122 in Primates with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Science* 327, 198–201. doi:10.1126/science.1178178
- Lange, C.M., Miki, D., Ochi, H., Nischalke, H.-D., Bojunga, J., Bibert, S., Morikawa, K., Gouttenoire, J., Cerny, A., Dufour, J.-F., Gorgievski-Hrisoho, M., Heim, M.H., Malinverni, R., Mullhaupt, B., Negro, F., Semela, D., Kutalik, Z., Muller, T., Spengler, U., Berg, T., Chayama, K., Moradpour, D., Bochud, P.-Y., 2013.** Genetic analyses reveal a role for vitamin D insufficiency in HCV-associated hepatocellular carcinoma development. *PLoS One* 8, e64053. doi:10.1371/journal.pone.0064053
- Lange, C.M., Zeuzem, S., 2013.** Perspectives and challenges of interferon-free therapy for chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* 58, 583–592.
- Launay, O., Floret, D., 2015.** Vaccination contre l'hépatite B. *médecine/sciences* 31, 551–558. doi:10.1051/medsci/20153105018
- Lavanchy, D., 2011.** Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical Microbiology and Infection* 17, 107–115. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03432.x
- Lavie, M., Sarrazin, S., Montserret, R., Descamps, V., Baumert, T.F., Duverlie, G., Seron, K., Penin, F., Dubuisson, J., 2014.** Identification of Conserved Residues in Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 That Modulate Virus Dependence on CD81 and SRB1 Entry Factors. *Journal of Virology* 88, 10584–10597. doi:10.1128/JVI.01402-14
- Lawitz, E., Gane, E., Pearlman, B., Tam, E., Ghesquiere, W., Guyader, D., Alric, L., Bronowicki, J.-P., Lester, L., Sievert, W., Ghalib, R., Balart, L., Sund, F., Lagging, M., Dutko, F., Shaughnessy, M., Hwang, P., Howe, A.Y.M., Wahl, J., Robertson, M., Barr, E., Haber, B., 2015a.** Efficacy and safety of 12 weeks versus 18 weeks of treatment with grazoprevir (MK-5172) and elbasvir (MK-8742) with or without ribavirin for hepatitis C virus genotype 1 infection in previously untreated patients with cirrhosis and patients with previous null response with or without cirrhosis (C-WORTHY): a randomised, open-label phase 2 trial. *Lancet* 385, 1075–1086. doi:10.1016/S0140-6736(14)61795-5
- Lawitz, E., Matusow, G., DeJesus, E., Yoshida, E.M., Felizarta, F., Ghalib, R., Godofsky,**

- E., Herring, R.W., Poleynard, G., Sheikh, A., Tobias, H., Kugelmas, M., Kalmeijer, R., Peeters, M., Lenz, O., Fevery, B., De La Rosa, G., Scott, J., Sinha, R., Witek, J., 2015b.** Simeprevir plus sofosbuvir in patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection and cirrhosis: A Phase 3 study (OPTIMIST-2). *Hepatology* n/a-n/a. doi:10.1002/hep.28422
- Lawitz, E., Sulkowski, M., Jacobson, I., Kraft, W.K., Maliakkal, B., Al-Ibrahim, M., Gordon, S.C., Kwo, P., Rockstroh, J.K., Panorchan, P., Miller, M., Caro, L., Barnard, R., Hwang, P.M., Gress, J., Quirk, E., Mobashery, N., 2013.** Characterization of vaniprevir, a hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor, in patients with HCV genotype 1 infection: safety, antiviral activity, resistance, and pharmacokinetics. *Antiviral Res* 99, 214–220. doi:10.1016/j.antiviral.2013.05.015
- Lawitz, E.J., Dvory-Sobol, H., Doehle, B.P., Worth, A.S., McNally, J., Brainard, D.M., Link, J.O., Miller, M.D., Mo, H., 2016.** Clinical Resistance to Velpatasvir (GS-5816), a Novel Pan-Genotypic Inhibitor of the Hepatitis C Virus NS5A Protein. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 5368–5378. doi:10.1128/AAC.00763-16
- Lazaro, C.A., Chang, M., Tang, W., Campbell, J., Sullivan, D.G., Gretch, D.R., Corey, L., Coombs, R.W., Fausto, N., 2007.** Hepatitis C Virus Replication in Transfected and Serum-Infected Cultured Human Fetal Hepatocytes. *The American Journal of Pathology* 170, 478–489. doi:10.2353/ajpath.2007.060789
- Lee, C., 2013.** Daclatasvir: potential role in hepatitis C. *Drug Design, Development and Therapy* 1223. doi:10.2147/DDDT.S40310
- Lee, M.-J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X., Bondoc, F.Y., Prabhu, S., Lambert, G., Mohr, S., Yang, C.S., 2002.** Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 1025–1032.
- Lee, S.R., Kardos, K.W., Schiff, E., Berne, C.A., Mounzer, K., Banks, A.T., Tatum, H.A., Friel, T.J., Demicco, M.P., Lee, W.M., Eder, S.E., Monto, A., Yearwood, G.D., Guillon, G.B., Kurtz, L.A., Fischl, M., Unangst, J.L., Kriebel, L., Feiss, G., Roehler, M., 2011.** Evaluation of a new, rapid test for detecting HCV infection, suitable for use with blood or oral fluid. *J Virol Methods* 172, 27–31. doi:10.1016/j.jviromet.2010.12.009
- Leroux-Roels, G., Depla, E., Hulstaert, F., Tობback, L., Dincq, S., Desmet, J., Desombere, I., Maertens, G., 2004.** A candidate vaccine based on the hepatitis C E1 protein: tolerability and immunogenicity in healthy volunteers. *Vaccine* 22, 3080–3086. doi:10.1016/j.vaccine.2004.02.002
- Lesburg, C.A., Cable, M.B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A.F., Weber, P.C., 1999.** Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* 6, 937–943. doi:10.1038/13305

- Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., Lemon, S.M., 2005.** Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2992–2997.
- Li, M., Li, J.-J., Gu, Q.-H., An, J., Cao, L.-M., Yang, H.-P., Hu, C.-P., 2016.** EGCG induces lung cancer A549 cell apoptosis by regulating Ku70 acetylation. *Oncol Rep* 35, 2339–2347. doi:10.3892/or.2016.4587
- Li, Q., Zhang, Y.-Y., Chiu, S., Hu, Z., Lan, K.-H., Cha, H., Sodroski, C., Zhang, F., Hsu, C.-S., Thomas, E., Liang, T.J., 2014.** Integrative functional genomics of hepatitis C virus infection identifies host dependencies in complete viral replication cycle. *PLoS Pathog* 10, e1004163. doi:10.1371/journal.ppat.1004163
- Li, S., Hattori, T., Kodama, E.N., 2011.** Epigallocatechin gallate inhibits the HIV reverse transcription step. *Antivir Chem Chemother* 21, 239–243. doi:10.3851/IMP1774
- Liang, Y., Ye, H., Kang, C.B., Yoon, H.S., 2007.** Domain 2 of Nonstructural Protein 5A (NS5A) of Hepatitis C Virus Is Natively Unfolded †. *Biochemistry* 46, 11550–11558. doi:10.1021/bi700776e
- Lin, L.-C., Wang, M.-N., Tseng, T.-Y., Sung, J.-S., Tsai, T.-H., 2007.** Pharmacokinetics of (-)-epigallocatechin-3-gallate in conscious and freely moving rats and its brain regional distribution. *J Agric Food Chem* 55, 1517–1524. doi:10.1021/jf062816a
- Lin, L.-T., Chung, C.-Y., Hsu, W.-C., Chang, S.-P., Hung, T.-C., Shields, J., Russell, R.S., Lin, C.-C., Li, C.-F., Yen, M.-H., Tyrrell, D.L.J., Lin, C.-C., Richardson, C.D., 2015.** Saikosaponin b2 is a naturally occurring terpenoid that efficiently inhibits hepatitis C virus entry. *J Hepatol* 62, 541–548. doi:10.1016/j.jhep.2014.10.040
- Lindenbach, B.D., 2013.** Virion assembly and release. *Curr Top Microbiol Immunol* 369, 199–218. doi:10.1007/978-3-642-27340-7_8
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., Rice, C.M., 2005.** Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623–626. doi:10.1126/science.1114016
- Lindenbach, B.D., Pragai, B.M., Montserret, R., Beran, R.K.F., Pyle, A.M., Penin, F., Rice, C.M., 2007.** The C Terminus of Hepatitis C Virus NS4A Encodes an Electrostatic Switch That Regulates NS5A Hyperphosphorylation and Viral Replication. *Journal of Virology* 81, 8905–8918. doi:10.1128/JVI.00937-07
- Lindow, M., Kauppinen, S., 2012.** Discovering the first microRNA-targeted drug. *J Cell Biol* 199, 407–412. doi:10.1083/jcb.201208082
- Link, J.O., Taylor, J.G., Xu, L., Mitchell, M., Guo, H., Liu, H., Kato, D., Kirschberg, T.,**

- Sun, J., Squires, N., Parrish, J., Keller, T., Yang, Z.-Y., Yang, C., Matles, M., Wang, Y., Wang, K., Cheng, G., Tian, Y., Mogalian, E., Mondou, E., Cornpropst, M., Perry, J., Desai, M.C., 2014.** Discovery of ledipasvir (GS-5885): a potent, once-daily oral NS5A inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. *J Med Chem* 57, 2033–2046. doi:10.1021/jm401499g
- Liu, M.-M., Zhou, L., He, P.-L., Zhang, Y.-N., Zhou, J.-Y., Shen, Q., Chen, X.-W., Zuo, J.-P., Li, W., Ye, D.-Y., 2012.** Discovery of flavonoid derivatives as anti-HCV agents via pharmacophore search combining molecular docking strategy. *European Journal of Medicinal Chemistry* 52, 33–43. doi:10.1016/j.ejmech.2012.03.002
- Liu, S., Li, H., Chen, L., Yang, L., Li, L., Tao, Y., Li, W., Li, Z., Liu, H., Tang, M., Bode, A.M., Dong, Z., Cao, Y., 2013.** (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibition of Epstein-Barr virus spontaneous lytic infection involves ERK1/2 and PI3-K/Akt signaling in EBV-positive cells. *Carcinogenesis* 34, 627–637. doi:10.1093/carcin/bgs364
- Liu, S., Wang, X.-J., Liu, Y., Cui, Y.-F., 2013.** PI3K/AKT/mTOR signaling is involved in (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of human pancreatic carcinoma cells. *Am J Chin Med* 41, 629–642. doi:10.1142/S0192415X13500444
- Liu, S., Kuo, W., Yang, W., Liu, W., Gibson, G.A., Dorko, K., Watkins, S.C., Strom, S.C., Wang, T., 2010.** The second extracellular loop dictates Occludin-mediated HCV entry. *Virology* 407, 160–170. doi:10.1016/j.virol.2010.08.009
- Liverton, N.J., Carroll, S.S., Dimuzio, J., Fandozzi, C., Graham, D.J., Hazuda, D., Holloway, M.K., Ludmerer, S.W., McCauley, J.A., McIntyre, C.J., Olsen, D.B., Rudd, M.T., Stahlhut, M., Vacca, J.P., 2010.** MK-7009, a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus NS3/4A protease. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 305–311. doi:10.1128/AAC.00677-09
- Lobstein, A., Brenne, X., Feist, E., Metz, N., Weniger, B., Anton, R., 2001.** Quantitative determination of naphthoquinones of *Impatiens* species. *Phytochem Anal* 12, 202–205. doi:10.1002/pca.574
- Lohmann, ., 1999.** Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line Inducible Protein Kinase PKR by.
- Lohmann, V., Bartenschlager, R., 2014.** On the History of Hepatitis C Virus Cell Culture Systems: Miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry* 57, 1627–1642. doi:10.1021/jm401401n
- Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F., Bartenschlager, R., 2003.** Viral and Cellular Determinants of Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *Journal of Virology* 77, 3007–3019. doi:10.1128/JVI.77.5.3007-3019.2003
- Lohmann, V., Korner, F., Herian, U., Bartenschlager, R., 1997.** Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* 71, 8416–8428.

- Lontok, E., Harrington, P., Howe, A., Kieffer, T., Lennerstrand, J., Lenz, O., McPhee, F., Mo, H., Parkin, N., Pilot-Matias, T., Miller, V., 2015.** Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology* 62, 1623–1632. doi:10.1002/hep.27934
- Lorenz, I.C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T.G., Rice, C.M., 2006.** Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* 442, 831–835. doi:10.1038/nature04975
- Lourenco, S., Costa, F., Debarges, B., Andrieu, T., Cahour, A., 2008.** Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by cis-acting RNA elements and trans-acting viral factors. *FEBS J* 275, 4179–4197. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06566.x
- Lozach, P.-Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F.-L., Altmeyer, R., 2004.** C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 279, 32035–32045. doi:10.1074/jbc.M402296200
- Lozach, P.-Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Foung, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., Altmeyer, R., 2003.** DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 278, 20358–20366. doi:10.1074/jbc.M301284200
- Lu, N.T., Crespi, C.M., Liu, N.M., Vu, J.Q., Ahmadieh, Y., Wu, S., Lin, S., McClune, A., Durazo, F., Saab, S., Han, S., Neiman, D.C., Beaven, S., French, S.W., 2016.** A Phase I Dose Escalation Study Demonstrates Quercetin Safety and Explores Potential for Bioflavonoid Antivirals in Patients with Chronic Hepatitis C. *Phytother Res* 30, 160–168. doi:10.1002/ptr.5518
- Luik, P., Chew, C., Aittoniemi, J., Chang, J., Wentworth, P.J., Dwek, R.A., Biggin, P.C., Venien-Bryan, C., Zitzmann, N., 2009.** The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12712–12716. doi:10.1073/pnas.0905966106
- Lundin, M., Lindstrom, H., Gronwall, C., Persson, M.A.A., 2006.** Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. *J Gen Virol* 87, 3263–3272. doi:10.1099/vir.0.82211-0
- Lundin, M., Monne, M., Widell, A., Von Heijne, G., Persson, M.A.A., 2003.** Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* 77, 5428–5438.
- Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., Royer, C., Fischer, B., Zahid, M.N., Lavillette, D., Fresquet, J., Cosset, F.-L., Rothenberg, S.M., Pietschmann, T., Patel, A.H., Pessaux, P., Doffoel, M., Raffelsberger, W., Poch, O., McKeating, J.A., Brino, L., Baumert, T.F., 2011.** EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry

and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 17, 589–595. doi:10.1038/nm.2341

Lyu, S.-Y., Rhim, J.-Y., Park, W.-B., 2005. Antitherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. *Arch Pharm Res* 28, 1293–1301.

M

Ma, Y.-C., Li, C., Gao, F., Xu, Y., Jiang, Z.-B., Liu, J.-X., Jin, L.-Y., 2014. Epigallocatechin gallate inhibits the growth of human lung cancer by directly targeting the EGFR signaling pathway. *Oncol Rep* 31, 1343–1349. doi:10.3892/or.2013.2933

Mabe, K., Yamada, M., Oguni, I., Takahashi, T., 1999. In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 1788–1791.

Machida, K., Cheng, K.T.-H., Pavio, N., Sung, V.M.-H., Lai, M.M.C., 2005. Hepatitis C Virus E2-CD81 Interaction Induces Hypermutation of the Immunoglobulin Gene in B Cells. *Journal of Virology* 79, 8079–8089. doi:10.1128/JVI.79.13.8079-8089.2005

Mack, C.L., Gonzalez-Peralta, R.P., Gupta, N., Leung, D., Narkewicz, M.R., Roberts, E.A., Rosenthal, P., Schwarz, K.B., 2012. NASPGHAN Practice Guidelines: Diagnosis and Management of Hepatitis C Infection in Infants, Children, and Adolescents. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 54, 838–855. doi:10.1097/MPG.0b013e318258328d

Madan, V., Bartenschlager, R., 2015. Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroprotein. *Viruses* 7, 4461–4481. doi:10.3390/v7082826

Madan, V., Paul, D., Lohmann, V., 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.e9. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.055

Maeda-Yamamoto, M., Suzuki, N., Sawai, Y., Miyase, T., Sano, M., Hashimoto-Ohta, A., Isemura, M., 2003. Association of Suppression of Extracellular Signal-Regulated Kinase Phosphorylation by Epigallocatechin Gallate with the Reduction of Matrix Metalloproteinase Activities in Human Fibrosarcoma HT1080 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1858–1863. doi:10.1021/jf021039l

Manach, C., Morand, C., Texier, O., Favier, M.L., Agullo, G., Demigne, C., Regeat, F., Remesy, C., 1995. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 125, 1911–1922.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C., 2005.** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81, 230S–242S.
- Mancone, C., Steindler, C., Santangelo, L., Simonte, G., Vlassi, C., Longo, M.A., D’Offizi, G., Di Giacomo, C., Pucillo, L.P., Amicone, L., Tripodi, M., Alonzi, T., 2011.** Hepatitis C virus production requires apolipoprotein A-I and affects its association with nascent low-density lipoproteins. *Gut* 60, 378–386. doi:10.1136/gut.2010.211292
- Marchese, A., Coppo, E., Sobolev, A., Rossi, D., Mannina, L., Daglia, M., 2014.** Influence of in vitro simulated gastroduodenal digestion on the antibacterial activity, metabolic profiling and polyphenols content of green tea (*Camellia sinensis*). *Food Research International*. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.036
- Marques, B., Lillebø, A.I., Pereira, E., Duarte, A.C., 2011.** Mercury cycling and sequestration in salt marshes sediments: An ecosystem service provided by *Juncus maritimus* and *Scirpus maritimus*. *Environmental Pollution* 159, 1869–1876. doi:10.1016/j.envpol.2011.03.036
- Martin, D.N., Uprichard, S.L., 2013.** Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 10777–10782. doi:10.1073/pnas.1301764110
- Marzio, D.L.H.-D., Fenkel, J.M., 2014.** Complementary and alternative medications in hepatitis C infection. *World J Hepatol* 6, 9–16. doi:10.4254/wjh.v6.i1.9
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T., 2008.** Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of Infectious Virus Particles. *Journal of Virology* 82, 7964–7976. doi:10.1128/JVI.00826-08
- Matheny, S.C., Kingery, J.E., 2012.** Hepatitis A. *Am Fam Physician* 86, 1027–34.
- Matsuda, M., Suzuki, R., Kataoka, C., Watashi, K., Aizaki, H., Kato, N., Matsuura, Y., Suzuki, T., Wakita, T., 2014.** Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *Journal of General Virology* 95, 2658–2667. doi:10.1099/vir.0.068528-0
- Matsumoto, H., Nakamura, Y., Iida, H., Ito, K., Ohguro, H., 2006.** Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. *Experimental Eye Research* 83, 348–356. doi:10.1016/j.exer.2005.12.019
- Matsumoto, H., Takenami, E., Iwasaki-Kurashige, K., Osada, T., Katsumura, T.,**

- Hamaoka, T., 2005.** Effects of blackcurrant anthocyanin intake on peripheral muscle circulation during typing work in humans. *European Journal of Applied Physiology* 94, 36–45. doi:10.1007/s00421-004-1279-y
- Matsumoto, Y., Matsuura, T., Aoyagi, H., Matsuda, M., Hmwe, S.S., Date, T., Watanabe, N., Watashi, K., Suzuki, R., Ichinose, S., Wake, K., Suzuki, T., Miyamura, T., Wakita, T., Aizaki, H., 2013.** Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. *PLoS One* 8, e68992. doi:10.1371/journal.pone.0068992
- Matsumura, T., Kato, T., Sugiyama, N., Tasaka-Fujita, M., Murayama, A., Masaki, T., Wakita, T., Imawari, M., 2012.** 25-Hydroxyvitamin D3 suppresses hepatitis C virus production. *Hepatology* 56, 1231–1239. doi:10.1002/hep.25763
- Matuschek, M.C., Hendriks, W.H., McGhie, T.K., Reynolds, G.W., 2006.** The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *J Nutr Biochem* 17, 31–36. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.04.005
- Maupas, P., Goudeau, A., Coursaget, P., Drucker, J., Bagros, P., 1976.** Immunisation against hepatitis B in man. *Lancet* 1, 1367–1370.
- McCaffrey, K., Gouklani, H., Boo, I., Pountourios, P., Drummer, H.E., 2011.** The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *Journal of General Virology* 92, 112–121. doi:10.1099/vir.0.026385-0
- McCaul, T.F., Tsiquaye, K.N., Tovey, G., Hames, C., Zuckerman, A.J., 1982.** Application of electron microscopy to the study of structural changes in the liver in non-A, non-B hepatitis. *J Virol Methods* 4, 87–106.
- McGivern, D.R., Masaki, T., Lovell, W., Hamlett, C., Saalau-Bethell, S., Graham, B., 2015.** Protease Inhibitors Block Multiple Functions of the NS3/4A Protease-Helicase during the Hepatitis C Virus Life Cycle. *J Virol* 89, 5362–5370. doi:10.1128/JVI.03188-14
- McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., Shiffman, M.L., Lee, W.M., Rustgi, V.K., Goodman, Z.D., Ling, M.H., Cort, S., Albrecht, J.K., 1998.** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339, 1485–1492. doi:10.1056/NEJM199811193392101
- McKay, D.L., Blumberg, J.B., 2002.** The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr* 21, 1–13.
- McLauchlan, J., Lemberg, M.K., Hope, G., Martoglio, B., 2002.** Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 21, 3980–3988. doi:10.1093/emboj/cdf414
- McMullan, L.K., Grakoui, A., Evans, M.J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A.D.,**

- Feinstone, S.M., Rice, C.M., 2007.** Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2879–2884.
- Mee, C.J., Grove, J., Harris, H.J., Hu, K., Balfe, P., McKeating, J.A., 2008.** Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry. *J Virol* 82, 461–470. doi:10.1128/JVI.01894-07
- Meeprasert, A., Hannongbua, S., Rungrotmongkol, T., 2014.** Key binding and susceptibility of NS3/4A serine protease inhibitors against hepatitis C virus. *J Chem Inf Model* 54, 1208–1217. doi:10.1021/ci400605a
- Meertens, L., Bertaux, C., Dragic, T., 2006.** Hepatitis C Virus Entry Requires a Critical Postinternalization Step and Delivery to Early Endosomes via Clathrin-Coated Vesicles. *Journal of Virology* 80, 11571–11578. doi:10.1128/JVI.01717-06
- Mendes-Correa, M.C.J., Barone, A.A., Gianini, R.J., 2005.** Risk factors associated with hepatitis C among patients co-infected with human immunodeficiency virus: a case-control study. *Am J Trop Med Hyg* 72, 762–767.
- Meng, X., Sang, S., Zhu, N., Lu, H., Sheng, S., Lee, M.-J., Ho, C.-T., Yang, C.S., 2002.** Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats. *Chem Res Toxicol* 15, 1042–1050.
- Menon, R.M., Badri, P.S., Wang, T., Polepally, A.R., Zha, J., Khatri, A., Wang, H., Hu, B., Coakley, E.P., Podsadecki, T.J., Awni, W.M., Dutta, S., 2015.** Drug-drug interaction profile of the all-oral anti-hepatitis C virus regimen of paritaprevir/ritonavir, ombitasvir, and dasabuvir. *J Hepatol* 63, 20–29. doi:10.1016/j.jhep.2015.01.026
- Menzel, N., Fischl, W., Hueging, K., Bankwitz, D., Frentzen, A., Haid, S., Gentzsch, J., Kaderali, L., Bartenschlager, R., Pietschmann, T., 2012.** MAP-Kinase Regulated Cytosolic Phospholipase A2 Activity Is Essential for Production of Infectious Hepatitis C Virus Particles. *PLoS Pathogens* 8, e1002829. doi:10.1371/journal.ppat.1002829
- Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., others, 2001.** Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature medicine* 7, 927–933.
- Meuleman, P., Hesselgesser, J., Paulson, M., Vanwolleghem, T., Desombere, I., Reiser, H., Leroux-Roels, G., 2008.** Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* 48, 1761–1768. doi:10.1002/hep.22547
- Meunier, J.-C., Gottwein, J.M., Houghton, M., Russell, R.S., Emerson, S.U., Bukh, J., Purcell, R.H., 2011.** Vaccine-induced cross-genotype reactive neutralizing antibodies against hepatitis C virus. *J Infect Dis* 204, 1186–1190. doi:10.1093/infdis/jir511

- Michalak, J.P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J.C., Ung, S., Rice, C.M., Dubuisson, J., 1997.** Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of General Virology* 78, 2299–2306.
- Mikkelsen, M., Holst, P.J., Bukh, J., Thomsen, A.R., Christensen, J.P., 2011.** Enhanced and Sustained CD8+ T Cell Responses with an Adenoviral Vector-Based Hepatitis C Virus Vaccine Encoding NS3 Linked to the MHC Class II Chaperone Protein Invariant Chain. *The Journal of Immunology* 186, 2355–2364. doi:10.4049/jimmunol.1001877
- Milbury, P.E., Vita, J.A., Blumberg, J.B., 2010.** Anthocyanins are bioavailable in humans following an acute dose of cranberry juice. *J Nutr* 140, 1099–1104. doi:10.3945/jn.109.117168
- Miller, R.J., Jackson, K.G., Dadd, T., Mayes, A.E., Brown, A.L., Lovegrove, J.A., Minihane, A.M., 2012.** The impact of the catechol-O-methyltransferase genotype on vascular function and blood pressure after acute green tea ingestion. *Molecular Nutrition & Food Research* 56, 966–975. doi:10.1002/mnfr.201100726
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., Shimotohno, K., 2007.** The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology* 9, 1089–1097. doi:10.1038/ncb1631
- Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A.D., Wiersma, S.T., 2013.** Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 57, 1333–1342.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Graber, P., Ghera, P., Smolarsky, M., Funaro, A., Malavasi, F., Larrey, D., Coste, J., Fabre, J.-M., Sa-Cunha, A., Maurel, P., 2007.** The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *Journal of Hepatology* 46, 411–419. doi:10.1016/j.jhep.2006.09.024
- Montenegro, I.P.F.M., Mucha, A.P., Reis, I., Rodrigues, P., Almeida, C.M.R., 2016.** Effect of petroleum hydrocarbons in copper phytoremediation by a salt marsh plant (*Juncus maritimus*) and the role of autochthonous bioaugmentation. *Environ Sci Pollut Res Int.* doi:10.1007/s11356-016-7154-7
- Moore, R.J., Jackson, K.G., Minihane, A.M., 2009.** Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *British Journal of Nutrition* 102, 1790. doi:10.1017/S0007114509991218
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., 2004.** Membrane Association of the RNA-Dependent RNA Polymerase Is Essential for Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of*

Virology 78, 13278–13284. doi:10.1128/JVI.78.23.13278-13284.2004

Moradpour, D., Brass, V., Penin, F., 2005. Function follows form: The structure of the N-terminal domain of HCV NS5A. *Hepatology* 42, 732–735.

Moradpour, D., Penin, F., 2013. Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function, in: Bartenschlager, R. (Ed.), *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 113–142.

Moradpour, D., Penin, F., Rice, C.M., 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology* 5, 453–463. doi:10.1038/nrmicro1645

Morikawa, K., Lange, C.M., Gouttenoire, J., Meylan, E., Brass, V., Penin, F., Moradpour, D., 2011. Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus: HCV NS3-4A. *Journal of Viral Hepatitis* 18, 305–315. doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01451.x

Moscato, G.A., Giannelli, G., Grandi, B., Pieri, D., Marsi, O., Guarducci, I., Batini, I., Altomare, E., Antonaci, S., Capria, A., Pellegrini, G., Sacco, R., 2011. Quantitative determination of hepatitis C core antigen in therapy monitoring for chronic hepatitis C. *Intervirology* 54, 61–65. doi:10.1159/000318878

Mullen, W., Borges, G., Lean, M.E.J., Roberts, S.A., Crozier, A., 2010. Identification of metabolites in human plasma and urine after consumption of a polyphenol-rich juice drink. *J Agric Food Chem* 58, 2586–2595. doi:10.1021/jf904096v

Muller, V.D., Soares, R.O., dos Santos-Junior, N.N., Trabuco, A.C., Cintra, A.C., Figueiredo, L.T., Caliri, A., Sampaio, S.V., Aquino, V.H., 2014. Phospholipase A2 Isolated from the Venom of *Crotalus durissus terrificus* Inactivates Dengue virus and Other Enveloped Viruses by Disrupting the Viral Envelope. *PLoS ONE* 9, e112351. doi:10.1371/journal.pone.0112351

Murray, C.L., Jones, C.T., Rice, C.M., 2008. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 6, 699–708. doi:10.1038/nrmicro1928

N

Naggie, S., 2012. Management of hepatitis C virus infection: the basics. *Top Antivir Med* 20, 154–161.

Naggie, S., Muir, A.J., 2016. Oral Combination Therapies for Hepatitis C Virus Infection: Successes, Challenges, and Unmet Needs. *Annu Rev Med*. doi:10.1146/annurev-med-052915-015720

Nahmias, Y., Casali, M., Barbe, L., Berthiaume, F., Yarmush, M.L., 2006. Liver endothelial cells promote LDL-R expression and the uptake of HCV-like particles

- in primary rat and human hepatocytes. *Hepatology* 43, 257–265.
doi:10.1002/hep.21016
- Nahmias, Y., Goldwasser, J., Casali, M., van Poll, D., Wakita, T., Chung, R.T., Yarmush, M.L., 2008.** Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 47, 1437–1445.
doi:10.1002/hep.22197
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J., 1982.** Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42, 3858–3863.
- Nakayama, M., Suzuki, K., Toda, M., Okubo, S., Hara, Y., Shimamura, T., 1993.** Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res* 21, 289–299.
- Nance, C.L., Shearer, W.T., 2003.** Is green tea good for HIV-1 infection? *Journal of allergy and clinical immunology* 112, 851–853.
- Neddermann, P., Quintavalle, M., Di Pietro, C., Clementi, A., Cerretani, M., Altamura, S., Bartholomew, L., De Francesco, R., 2004.** Reduction of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation by Selective Inhibition of Cellular Kinases Activates Viral RNA Replication in Cell Culture. *Journal of Virology* 78, 13306–13314.
doi:10.1128/JVI.78.23.13306-13314.2004
- Nelson, P.K., Mathers, B.M., Cowie, B., Hagan, H., Des Jarlais, D., Horyniak, D., Degenhardt, L., 2011.** Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet* 378, 571–583.
doi:10.1016/S0140-6736(11)61097-0
- Neumann, A.U., Lam, N.P., Dahari, H., Gretch, D.R., Wiley, T.E., Layden, T.J., Perelson, A.S., 1998.** Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282, 103–107.
- Ni, X., Wang, H., 2016.** Silymarin attenuated hepatic steatosis through regulation of lipid metabolism and oxidative stress in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Am J Transl Res* 8, 1073–1081.
- Nielsen, S.U., Bassendine, M.F., Burt, A.D., Martin, C., Pumeechockchai, W., Toms, G.L., 2006.** Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* 80, 2418–2428. doi:10.1128/JVI.80.5.2418-2428.2006
- Nohynek, L.J., Alakomi, H.-L., Kähkönen, M.P., Heinonen, M., Helander, I.M., Oksman-Caldentey, K.-M., Puupponen-Pimiä, R.H., 2006.** Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and cancer* 54, 18–32.

O

- O'Brien, R.J., Wong, P.C., 2011.** Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual Review of Neuroscience* 34, 185–204. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613
- Oehler, V., Filipe, A., Montserret, R., da Costa, D., Brown, G., Penin, F., McLauchlan, J., 2012.** Structural analysis of hepatitis C virus core-E1 signal peptide and requirements for cleavage of the genotype 3a signal sequence by signal peptide peptidase. *J Virol* 86, 7818–7828. doi:10.1128/JVI.00457-12
- Okamoto, K., Mori, Y., Komoda, Y., Okamoto, T., Okochi, M., Takeda, M., Suzuki, T., Moriishi, K., Matsuura, Y., 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. doi:10.1128/JVI.00306-08
- Ollis, D.L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N.G., Steitz, T.A., 1985.** Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature* 313, 762–766.
- Olsen, D.B., Davies, M.-E., Handt, L., Koeplinger, K., Zhang, N.R., Ludmerer, S.W., Graham, D., Liverton, N., MacCoss, M., Hazuda, D., Carroll, S.S., 2011.** Sustained Viral Response in a Hepatitis C Virus-Infected Chimpanzee via a Combination of Direct-Acting Antiviral Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 937–939. doi:10.1128/AAC.00990-10
- Ouwerkerk-Mahadevan, S., Snoeys, J., Peeters, M., Beumont-Mauviel, M., Simion, A., 2016.** Drug-Drug Interactions with the NS3/4A Protease Inhibitor Simeprevir. *Clin Pharmacokinet* 55, 197–208. doi:10.1007/s40262-015-0314-y
- Owen, D.M., Huang, H., Ye, J., Gale, M., 2009.** Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 394, 99–108. doi:10.1016/j.virol.2009.08.037

P

- Paeshuyse, J., Kaul, A., De Clercq, E., Rosenwirth, B., Dumont, J.-M., Scalfaro, P., Bartenschlager, R., Neyts, J., 2006.** The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* 43, 761–770. doi:10.1002/hep.21102
- Palomares-Jerez, M.F., Nemesio, H., Villalain, J., 2012.** Interaction with membranes of the full C-terminal domain of protein NS4B from hepatitis C virus. *Biochim Biophys Acta* 1818, 2536–2549. doi:10.1016/j.bbamem.2012.06.012

- Pang, J., Zhao, K., Wang, J., Ma, Z., Xiao, X., 2014.** Green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, possesses the antiviral activity necessary to fight against the hepatitis B virus replication in vitro. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 15, 533–539. doi:10.1631/jzus.B1300307
- Pasquinelli, C., McPhee, F., Eley, T., Villegas, C., Sandy, K., Sheridan, P., Persson, A., Huang, S.-P., Hernandez, D., Sheaffer, A.K., Scola, P., Marbury, T., Lawitz, E., Goldwater, R., Rodriguez-Torres, M., Demicco, M., Wright, D., Charlton, M., Kraft, W.K., Lopez-Talavera, J.-C., Grasela, D.M., 2012.** Single- and multiple-ascending-dose studies of the NS3 protease inhibitor asunaprevir in subjects with or without chronic hepatitis C. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 1838–1844. doi:10.1128/AAC.05854-11
- Patidar, K., Deshmukh, A., Bandaru, S., Lakkaraju, C., Girdhar, A., Vr, G., Banerjee, T., Nayarisseri, A., Singh, S.K., 2016.** Virtual Screening Approaches in Identification of Bioactive Compounds Akin to Delphinidin as Potential HER2 Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 17, 2291–2295.
- Paul, D., Hoppe, S., Saher, G., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., 2013.** Morphological and Biochemical Characterization of the Membranous Hepatitis C Virus Replication Compartment. *Journal of Virology* 87, 10612–10627. doi:10.1128/JVI.01370-13
- Pawlotsky, J.-M., 2016.** Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology* 151, 70–86. doi:10.1053/j.gastro.2016.04.003
- Pawlotsky, J.-M., 2014.** New Hepatitis C Virus (HCV) Drugs and the Hope for a Cure: Concepts in Anti-HCV Drug Development. *Seminars in Liver Disease* 34, 022–029. doi:10.1055/s-0034-1371007
- Pawlotsky, J.-M., 2013.** NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *Journal of hepatology* 59, 375–382.
- Pawlotsky, J.-M., 2011.** Treatment failure and resistance with direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus. *Hepatology* 53, 1742–1751. doi:10.1002/hep.24262
- Pawlotsky, J.-M., Aghemo, A., Back, D., others, 2015.** EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2015. *J hepatol* 63, 199–236.
- Pawlotsky, J.-M., Dahari, H., Neumann, A.U., Hezode, C., Germanidis, G., Lonjon, I., Castera, L., Dhumeaux, D., 2004.** Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 126, 703–714. doi:10.1053/j.gastro.2003.12.002
- Pearson, T., Shultz, L.D., Miller, D., King, M., Laning, J., Fodor, W., Cuthbert, A., Burzenski, L., Gott, B., Lyons, B., Foreman, O., Rossini, A.A., Greiner, D.L., 2008.** Non-obese diabetic-recombination activating gene-1 (NOD-Rag1 null)

interleukin (IL)-2 receptor common gamma chain (IL2r gamma null) null mice: a radioresistant model for human lymphohaematopoietic engraftment. *Clin Exp Immunol* 154, 270–284. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03753.x

Pène, V., Hernandez, C., Vauloup-Fellous, C., Garaud-Aunis, J., Rosenberg, A.R., 2009. Sequential processing of hepatitis C virus core protein by host cell signal peptidase and signal peptide peptidase: a reassessment. *Journal of Viral Hepatitis* 16, 705–715. doi:10.1111/j.1365-2893.2009.01118.x

Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P.-O., Deleage, G., Pawlotsky, J.-M., 2001. Conservation of the Conformation and Positive Charges of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Hypervariable Region 1 Points to a Role in Cell Attachment. *Journal of Virology* 75, 5703–5710. doi:10.1128/JVI.75.12.5703-5710.2001

Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., Pawlotsky, J.-M., 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39, 5–19. doi:10.1002/hep.20032

Perez-Jimenez, J., Hubert, J., Hooper, L., Cassidy, A., Manach, C., Williamson, G., Scalbert, A., 2010. Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition* 92, 801–809. doi:10.3945/ajcn.2010.29924

Perz, J.F., Armstrong, G.L., Farrington, L.A., Hutin, Y.J.F., Bell, B.P., 2006. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of Hepatology* 45, 529–538. doi:10.1016/j.jhep.2006.05.013

Pessoa, L.S., Vidal, L.L., Costa, E.C.B. da, Abreu, C.M., Cunha, R.D. da, Valadao, A.L.C., Santos, A.F.D., Tanuri, A., 2016. Development of a rapid phenotypic test for HCV protease inhibitors with potential use in clinical decisions. *Genet Mol Biol* 39, 358–364. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0022

Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.-L., Bartenschlager, R., 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7408–7413. doi:10.1073/pnas.0504877103

Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D., Bartenschlager, R., 2002. Persistent and Transient Replication of Full-Length Hepatitis C Virus Genomes in Cell Culture. *Journal of Virology* 76, 4008–4021. doi:10.1128/JVI.76.8.4008-4021.2002

Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K., Bartenschlager, R., 2001. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 75, 1252–1264. doi:10.1128/JVI.75.3.1252-1264.2001

Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J.,

- Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., Abrignani, S., 1998.** Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938–941.
- Pilot-Matias, T., Tripathi, R., Cohen, D., Gaultier, I., Dekhtyar, T., Lu, L., Reisch, T., Irvin, M., Hopkins, T., Pithawalla, R., Middleton, T., Ng, T., McDaniel, K., Or, Y.S., Menon, R., Kempf, D., Molla, A., Collins, C., 2015.** In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor ABT-450. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 988–997. doi:10.1128/AAC.04227-14
- Piver, E., Boyer, A., Gaillard, J., Bull, A., Beaumont, E., Roingeard, P., Meunier, J.-C., 2016.** Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2016-311726
- Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P., Rice, C.M., 2009.** Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457, 882–886. doi:10.1038/nature07684
- Ploss, A., Khetani, S.R., Jones, C.T., Syder, A.J., Trehan, K., Gaysinskaya, V.A., Mu, K., Ritola, K., Rice, C.M., Bhatia, S.N., 2010.** Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 3141–3145. doi:10.1073/pnas.0915130107
- Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., McKeating, J.A., 2003.** Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 77, 4070–4080.
- Polyak, S.J., Ferenci, P., Pawlotsky, J.-M., 2013.** Hepatoprotective and antiviral functions of silymarin components in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 57, 1262–1271. doi:10.1002/hep.26179
- Polyak, S.J., Morishima, C., Lohmann, V., Pal, S., Lee, D.Y.W., Liu, Y., Graf, T.N., Oberlies, N.H., 2010.** Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 5995–5999. doi:10.1073/pnas.0914009107
- Polyak, S.J., Oberlies, N.H., Pécheur, E.-I., Dahari, H., Ferenci, P., Pawlotsky, J.-M., 2013.** Silymarin for HCV infection. *Antiviral Therapy* 18, 141–147. doi:10.3851/IMP2402
- Poordad, F., McCone, J., Bacon, B.R., Bruno, S., Manns, M.P., Sulkowski, M.S., Jacobson, I.M., Reddy, K.R., Goodman, Z.D., Boparai, N., DiNubile, M.J., Sniukiene, V., Brass, C.A., Albrecht, J.K., Bronowicki, J.-P., 2011.** Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *New England Journal of Medicine* 364, 1195–1206. doi:10.1056/NEJMoa1010494
- Popescu, C.-I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Hélot, L., Rouillé, Y., Dubuisson, J., 2011.** NS2 Protein

of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly. *PLoS Pathogens* 7, e1001278. doi:10.1371/journal.ppat.1001278

Popescu, C.-I., Riva, L., Vlaicu, O., Farhat, R., Rouillé, Y., Dubuisson, J., 2014. Hepatitis C Virus Life Cycle and Lipid Metabolism. *Biology* 3, 892–921. doi:10.3390/biology3040892

Popovych, N., Brender, J.R., Soong, R., Vivekanandan, S., Hartman, K., Basrur, V., Macdonald, P.M., Ramamoorthy, A., 2012. Site Specific Interaction of the Polyphenol EGCG with the SEVI Amyloid Precursor Peptide PAP(248–286). *The Journal of Physical Chemistry B* 116, 3650–3658. doi:10.1021/jp2121577

Pouliot, J.J., Thomson, M., Xie, M., Horton, J., Johnson, J., Krull, D., Mathis, A., Morikawa, Y., Parks, D., Peterson, R., Shimada, T., Thomas, E., Vamathevan, J., Van Horn, S., Xiong, Z., Hamatake, R., Peat, A.J., 2015. Preclinical Characterization and In Vivo Efficacy of GSK8853, a Small-Molecule Inhibitor of the Hepatitis C Virus NS4B Protein. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 6539–6550. doi:10.1128/AAC.00813-15

Poynard, T., Bedossa, P., Chevallier, M., Mathurin, P., Lemonnier, C., Trepo, C., Couzigou, P., Payen, J.L., Sajus, M., Costa, J.M., 1995. A comparison of three interferon alfa-2b regimens for the long-term treatment of chronic non-A, non-B hepatitis. Multicenter Study Group. *N Engl J Med* 332, 1457–1462. doi:10.1056/NEJM199506013322201

Poynard, T., Bedossa, P., Opolon, P., 1997. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The obsvir, matavir, clinivir and dosvir groups. *Lancet* 349, 825–832.

Prentoe, J., Jensen, T.B., Meuleman, P., Serre, S.B.N., Scheel, T.K.H., Leroux-Roels, G., Gottwein, J.M., Bukh, J., 2011. Hypervariable region 1 differentially impacts viability of hepatitis C virus strains of genotypes 1 to 6 and impairs virus neutralization. *J Virol* 85, 2224–2234. doi:10.1128/JVI.01594-10

Prince, A.M., 1968. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60, 814–821.

Pumeechockchai, W., Bevitt, D., Agarwal, K., Petropoulou, T., Langer, B.C.A., Belohradsky, B., Bassendine, M.F., Toms, G.L., 2002. Hepatitis C virus particles of different density in the blood of chronically infected immunocompetent and immunodeficient patients: Implications for virus clearance by antibody. *J Med Virol* 68, 335–342. doi:10.1002/jmv.10208

R

Raboisson, P., de Kock, H., Rosenquist, A., Nilsson, M., Salvador-Oden, L., Lin, T.-I.,

- Roue, N., Ivanov, V., Wahling, H., Wickstrom, K., Hamelink, E., Edlund, M., Vrang, L., Vendeville, S., Van de Vreken, W., McGowan, D., Tahri, A., Hu, L., Boutton, C., Lenz, O., Delouvroy, F., Pille, G., Surleraux, D., Wigerinck, P., Samuelsson, B., Simmen, K., 2008.** Structure-activity relationship study on a novel series of cyclopentane-containing macrocyclic inhibitors of the hepatitis C virus NS3/4A protease leading to the discovery of TMC435350. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 4853–4858. doi:10.1016/j.bmcl.2008.07.088
- Radhakrishnan, R., Kulhari, H., Pooja, D., Gudem, S., Bhargava, S., Shukla, R., Sistla, R., 2016.** Encapsulation of biophenolic phytochemical EGCG within lipid nanoparticles enhances its stability and cytotoxicity against cancer. *Chemistry and Physics of Lipids* 198, 51–60. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.05.006
- Ramirez, S., Li, Y.-P., Jensen, S.B., Pedersen, J., Gottwein, J.M., Bukh, J., 2014.** Highly efficient infectious cell culture of three hepatitis C virus genotype 2b strains and sensitivity to lead protease, nonstructural protein 5A, and polymerase inhibitors. *Hepatology* 59, 395–407. doi:10.1002/hep.26660
- Ramos, S., 2008.** Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 507–526. doi:10.1002/mnfr.200700326
- Rashed, K., Sahuc, M.-E., Deloison, G., Calland, N., Brodin, P., Rouillé, Y., Séron, K., 2014.** Potent antiviral activity of *Solanum rantonnetii* and the isolated compounds against hepatitis C virus in vitro. *Journal of Functional Foods* 11, 185–191. doi:10.1016/j.jff.2014.09.022
- Rasoolijazi, H., Joghataie, M.T., Roghani, M., Nobakht, M., 2007.** The beneficial effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate in an experimental model of Alzheimer's disease in rat: a behavioral analysis. *Iran Biomed J* 11, 237–243.
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.-S., Longerich, T., Diehl, S., Ramirez, F., Balla, T., Rohr, K., Kaul, A., Bühler, S., Pepperkok, R., Lengauer, T., Albrecht, M., Eils, R., Schirmacher, P., Lohmann, V., Bartenschlager, R., 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. doi:10.1016/j.chom.2010.12.002
- Rembeck, K., Lagging, M., 2015.** Impact of *IL28B*, *ITPA* and *PNPLA3* genetic variants on therapeutic outcome and progression of hepatitis C virus infection. *Pharmacogenomics* 16, 1179–1188. doi:10.2217/pgs.15.65
- Rendeiro, C., Guerreiro, J.D.T., Williams, C.M., Spencer, J.P.E., 2012.** Flavonoids as modulators of memory and learning: molecular interactions resulting in behavioural effects. *Proc Nutr Soc* 71, 246–262. doi:10.1017/S0029665112000146
- Rey, D., Muret, P., Piroth, L., 2016.** Optimum combination therapy regimens for

- HIV/HCV infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 14, 299–309. doi:10.1586/14787210.2016.1147952
- Reygaert, W.C., 2014.** The antimicrobial possibilities of green tea. *Frontiers in Microbiology* 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00434
- Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., 1995.** Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 4942–4946.
- Ribeiro, H., Almeida, C.M.R., Magalhaes, C., Bordalo, A.A., Mucha, A.P., 2015.** Salt marsh sediment characteristics as key regulators on the efficiency of hydrocarbons bioremediation by *Juncus maritimus* rhizospheric bacterial community. *Environ Sci Pollut Res Int* 22, 450–462. doi:10.1007/s11356-014-3388-4
- Ribeiro, H., Mucha, A.P., Almeida, C.M.R., Bordalo, A.A., 2014.** Potential of phytoremediation for the removal of petroleum hydrocarbons in contaminated salt marsh sediments. *J Environ Manage* 137, 10–15. doi:10.1016/j.jenvman.2014.01.047
- Ribeiro, H., Mucha, A.P., Almeida, C.M.R., Bordalo, A.A., 2013.** Bacterial community response to petroleum contamination and nutrient addition in sediments from a temperate salt marsh. *Sci Total Environ* 458–460, 568–576. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.015
- Ribeiro, R.M., Li, H., Wang, S., Stoddard, M.B., Learn, G.H., Korber, B.T., Bhattacharya, T., Guedj, J., Parrish, E.H., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Perelson, A.S., 2012.** Quantifying the Diversification of Hepatitis C Virus (HCV) during Primary Infection: Estimates of the In Vivo Mutation Rate. *PLoS Pathogens* 8, e1002881. doi:10.1371/journal.ppat.1002881
- Rigotti, A., Miettinen, H.E., Krieger, M., 2003.** The Role of the High-Density Lipoprotein Receptor SR-BI in the Lipid Metabolism of Endocrine and Other Tissues. *Endocrine Reviews* 24, 357–387. doi:10.1210/er.2001-0037
- Roberts, E.A., Yeung, L., 2002.** Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 36, S106-113. doi:10.1053/jhep.2002.36792
- Roccasecca, R., Ansuini, H., Vitelli, A., Meola, A., Scarselli, E., Acali, S., Pezzanera, M., Ercole, B.B., McKeating, J., Yagnik, A., Lahm, A., Tramontano, A., Cortese, R., Nicosia, A., 2003.** Binding of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein to CD81 Is Strain Specific and Is Modulated by a Complex Interplay between Hypervariable Regions 1 and 2. *Journal of Virology* 77, 1856–1867. doi:10.1128/JVI.77.3.1856-1867.2003
- Roelandt, P., Obeid, S., Paeshuyse, J., Vanhove, J., Van Lommel, A., Nahmias, Y., Nevens, F., Neyts, J., Verfaillie, C.M., 2012.** Human pluripotent stem cell-derived hepatocytes support complete replication of hepatitis C virus. *Journal of*

hepatology 57, 246–251.

- Roh, C., Jo, S.-K., 2011.** (–)-Epigallocatechin gallate inhibits hepatitis C virus (HCV) viral protein NS5B. *Talanta* 85, 2639–2642. doi:10.1016/j.talanta.2011.08.035
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.-Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., Walther, P., Antony, C., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., 2012.** Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLoS Pathogens* 8, e1003056. doi:10.1371/journal.ppat.1003056
- Rosenquist, A., Samuelsson, B., Johansson, P.-O., Cummings, M.D., Lenz, O., Raboisson, P., Simmen, K., Vendeville, S., de Kock, H., Nilsson, M., Horvath, A., Kalmeijer, R., de la Rosa, G., Beumont-Mauviel, M., 2014.** Discovery and development of simeprevir (TMC435), a HCV NS3/4A protease inhibitor. *J Med Chem* 57, 1673–1693. doi:10.1021/jm401507s
- Rouille, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A.H., Maertens, G., Wakita, T., Wychowski, C., Dubuisson, J., 2006.** Subcellular Localization of Hepatitis C Virus Structural Proteins in a Cell Culture System That Efficiently Replicates the Virus. *Journal of Virology* 80, 2832–2841. doi:10.1128/JVI.80.6.2832-2841.2006
- Roussel, J., Pillez, A., Montpellier, C., Duverlie, G., Cahour, A., Dubuisson, J., Wychowski, C., 2003.** Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *J Gen Virol* 84, 1751–1759. doi:10.1099/vir.0.19065-0
- Sainz, B.J., Barretto, N., Martin, D.N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K.A., Yu, X., Chayama, K., Alrefai, W.A., Uprichard, S.L., 2012a.** Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 18, 281–285. doi:10.1038/nm.2581
- Saito, I., Miyamura, T., Ohbayashi, A., Harada, H., Katayama, T., Kikuchi, S., Watanabe, Y., Koi, S., Onji, M., Ohta, Y., 1990.** Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 6547–6549.

S

- Sahli, R., Riviere, C., Sahuc, M.E., Abderrazak, S., Samaillie, J., Roumy, V., Hennebelle, T., Rouille, Y., Seron, K., Sahpaz, S., Ksouri, R., 2016.** A new inhibitor of hepatitis C virus replication from *Juncus maritimus*, a Tunisian extremophile plant. *Planta Med* 81, S1–S381. doi:10.1055/s-0036-1596529
- Sanford, M., 2015.** Simeprevir: a review of its use in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Drugs* 75, 183–196. doi:10.1007/s40265-014-0341-2

- Santolini, E., Migliaccio, G., La Monica, N., 1994.** Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 68, 3631–3641.
- Sarrazin, C., Zeuzem, S., 2010.** Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 138, 447–462. doi:10.1053/j.gastro.2009.11.055
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., Vitelli, A., 2002.** The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO journal* 21, 5017–5025.
- Schalm, S.W., Fattovich, G., Brouwer, J.T., 1997.** Therapy of hepatitis C: patients with cirrhosis. *Hepatology* 26.
- Schantz, M., Erk, T., Richling, E., 2010.** Metabolism of green tea catechins by the human small intestine. *Biotechnol J* 5, 1050–1059. doi:10.1002/biot.201000214
- Scheel, T.K.H., Gottwein, J.M., Carlsen, T.H.R., Li, Y.-P., Jensen, T.B., Spengler, U., Weis, N., Bukh, J., 2011.** Efficient culture adaptation of hepatitis C virus recombinants with genotype-specific core-NS2 by using previously identified mutations. *J Virol* 85, 2891–2906. doi:10.1128/JVI.01605-10
- Scheel, T.K.H., Simmonds, P., Kapoor, A., 2015.** Surveying the global virome: identification and characterization of HCV-related animal hepaciviruses. *Antiviral Res* 115, 83–93. doi:10.1016/j.antiviral.2014.12.014
- Schlaphoff, V., Klade, C.S., Jilma, B., Jelovcan, S.B., Cornberg, M., Tauber, E., Manns, M.P., Wedemeyer, H., 2007.** Functional and phenotypic characterization of peptide-vaccine-induced. *Vaccine* 25, 6793–6806. doi:10.1016/j.vaccine.2007.06.026
- Schmidt-Mende, J., Bieck, E., Hugle, T., Penin, F., Rice, C.M., Blum, H.E., Moradpour, D., 2001.** Determinants for Membrane Association of the Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 44052–44063. doi:10.1074/jbc.M103358200
- Scholey, A., Downey, L.A., Ciorciari, J., Pipingas, A., Nolidin, K., Finn, M., Wines, M., Catchlove, S., Terrens, A., Barlow, E., Gordon, L., Stough, C., 2012.** Acute neurocognitive effects of epigallocatechin gallate (EGCG). *Appetite* 58, 767–770. doi:10.1016/j.appet.2011.11.016
- Schregel, V., Jacobi, S., Penin, F., Tautz, N., 2009.** Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 5342–5347.
- Schvarcz, R., Yun, Z.B., Sönnnerborg, A., Weiland, O., 1995.** Combined treatment with interferon alpha-2b and ribavirin for chronic hepatitis C in patients with a previous non-response or non-sustained response to interferon alone. *Journal of*

medical virology 46, 43–47.

- Schwartz, R.E., Trehan, K., Andrus, L., Sheahan, T.P., Ploss, A., Duncan, S.A., Rice, C.M., Bhatia, S.N., 2012.** Modeling hepatitis C virus infection using human induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 2544–2548. doi:10.1073/pnas.1121400109
- Scola, P.M., Sun, L.-Q., Wang, A.X., Chen, J., Sin, N., Venables, B.L., Sit, S.-Y., Chen, Y., Cocuzza, A., Bilder, D.M., D’Andrea, S.V., Zheng, B., Hewawasam, P., Tu, Y., Friborg, J., Falk, P., Hernandez, D., Levine, S., Chen, C., Yu, F., Sheaffer, A.K., Zhai, G., Barry, D., Knipe, J.O., Han, Y.-H., Schartman, R., Donoso, M., Mosure, K., Sinz, M.W., Zvyaga, T., Good, A.C., Rajamani, R., Kish, K., Tredup, J., Klei, H.E., Gao, Q., Mueller, L., Colonno, R.J., Grasela, D.M., Adams, S.P., Loy, J., Levesque, P.C., Sun, H., Shi, H., Sun, L., Warner, W., Li, D., Zhu, J., Meanwell, N.A., McPhee, F., 2014.** The discovery of asunaprevir (BMS-650032), an orally efficacious NS3 protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. *J Med Chem* 57, 1730–1752. doi:10.1021/jm500297k
- Seeff, L., 2001.** Long-term mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B, and type C hepatitis: A National Heart, Lung, and Blood Institute collaborative study. *Hepatology* 33, 455–463. doi:10.1053/jhep.2001.21905
- Selby, M.J., Glazer, E., Masiarz, F., Houghton, M., 1994.** Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology* 204, 114–122. doi:10.1006/viro.1994.1515
- Sendi, H., Mehrab-Mohseni, M., Foureau, D.M., Ghosh, S., Walling, T.L., Steuerwald, N., Zamor, P.J., Kaplan, K.J., Jacobs, C., Ahrens, W.A., Russo, M.W., Clemens, M.G., Schrum, L.W., Bonkovsky, H.L., 2015.** miR-122 decreases HCV entry into hepatocytes through binding to the 3’ UTR of OCLN mRNA. *Liver International* 35, 1315–1323. doi:10.1111/liv.12698
- Sharma, N.R., Mateu, G., Dreux, M., Grakoui, A., Cosset, F.-L., Melikyan, G.B., 2011.** Hepatitis C Virus Is Primed by CD81 Protein for Low pH-dependent Fusion. *Journal of Biological Chemistry* 286, 30361–30376. doi:10.1074/jbc.M111.263350
- Shi, G., Ando, T., Suzuki, R., Matsuda, M., Nakashima, K., Ito, M., Omatsu, T., Oba, M., Ochiai, H., Kato, T., Mizutani, T., Sawasaki, T., Wakita, T., Suzuki, T., 2016.** Involvement of the 3’ Untranslated Region in Encapsidation of the Hepatitis C Virus. *PLOS Pathogens* 12, e1005441. doi:10.1371/journal.ppat.1005441
- Shi, Q., Jiang, J., Luo, G., 2013.** Syndecan-1 Serves as the Major Receptor for Attachment of Hepatitis C Virus to the Surfaces of Hepatocytes. *Journal of Virology* 87, 6866–6875. doi:10.1128/JVI.03475-12
- Shi, W., Freitas, I.T., Zhu, C., Zheng, W., Hall, W.W., Higgins, D.G., 2012.** Recombination in Hepatitis C Virus: Identification of Four Novel Naturally Occurring Inter-Subtype Recombinants. *PLoS ONE* 7, e41997.

doi:10.1371/journal.pone.0041997

- Shimoike, T., Koyama, C., Murakami, K., Suzuki, R., Matsuura, Y., Miyamura, T., Suzuki, T., 2006.** Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop III_d domain of IRES and the viral core protein. *Virology* 345, 434–445. doi:10.1016/j.virol.2005.10.013
- Shindo, M., Di Bisceglie, A.M., Cheung, L., Shih, J.W., Cristiano, K., Feinstone, S.M., Hoofnagle, J.H., 1991.** Decrease in serum hepatitis C viral RNA during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 115, 700–704.
- Shivkumar, S., Peeling, R., Jafari, Y., Joseph, L., Pai, N.P., 2012.** Accuracy of rapid and point-of-care screening tests for hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine* 157, 558–566.
- Shrivastava, A., Manna, S.K., Ray, R., Aggarwal, B.B., 1998.** Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *J Virol* 72, 9722–9728.
- Singh, B.N., Shankar, S., Srivastava, R.K., 2011.** Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology* 82, 1807–1821. doi:10.1016/j.bcp.2011.07.093
- Skidmore, S.J., Tadros, F., 1976.** Hepatitis A virus. *Lancet* 2, 848–849.
- Smith, D.B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A.S., Rice, C.M., Stapleton, J.T., Simmonds, P., 2014.** Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 59, 318–327. doi:10.1002/hep.26744
- Song, J.-M., Lee, K.-H., Seong, B.-L., 2005.** Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research* 68, 66–74. doi:10.1016/j.antiviral.2005.06.010
- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Junemann, C., Bartenschlager, R., 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. doi:10.1128/JVI.00675-06
- Soriano, V., Poveda, E., Vispo, E., Labarga, P., Rallon, N., Barreiro, P., 2012.** Pharmacogenetics of hepatitis C. *J Antimicrob Chemother* 67, 523–529. doi:10.1093/jac/dkr506
- Spangberg, K., Goobar-Larsson, L., Wahren-Herlenius, M., Schwartz, S., 1999.** The La protein from human liver cells interacts specifically with the U-rich region in the hepatitis C virus 3' untranslated region. *J Hum Virol* 2, 296–307.
- Stamatakis, Z., Coates, S., Abrignani, S., Houghton, M., McKeating, J.A., 2011.**

Immunization of human volunteers with hepatitis C virus envelope glycoproteins elicits antibodies that cross-neutralize heterologous virus strains. *J Infect Dis* 204, 811–813. doi:10.1093/infdis/jir399

Steinmann, E., Brohm, C., Kallis, S., Bartenschlager, R., Pietschmann, T., 2008. Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles. *J Virol* 82, 7034–7046. doi:10.1128/JVI.00118-08

Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R., Pietschmann, T., 2007. Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS Pathogens* 3, e103. doi:10.1371/journal.ppat.0030103

Steinmann, E., Pietschmann, T., 2013. Cell Culture Systems for Hepatitis C Virus, in: Bartenschlager, R. (Ed.), *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 17–48.

Steinmann, E., Pietschmann, T., 2010. Hepatitis C Virus P7—A Viroporin Crucial for Virus Assembly and an Emerging Target for Antiviral Therapy. *Viruses* 2, 2078–2095. doi:10.3390/v2092078

Steinmann, J., Buer, J., Pietschmann, T., Steinmann, E., 2013. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea: Anti-infective effects of EGCG. *British Journal of Pharmacology* 168, 1059–1073. doi:10.1111/bph.12009

Stone, M., Jia, S., Heo, W.D., Meyer, T., Konan, K.V., 2007. Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. *J Virol* 81, 4551–4563. doi:10.1128/JVI.01366-06

Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023, 2013. . Organisation mondiale de la santé, Genève.

Sulkowski, M., Hezode, C., Gerstoft, J., Vierling, J.M., Mallolas, J., Pol, S., Kugelmas, M., Murillo, A., Weis, N., Nahass, R., Shibolet, O., Serfaty, L., Bourliere, M., DeJesus, E., Zuckerman, E., Dutko, F., Shaughnessy, M., Hwang, P., Howe, A.Y.M., Wahl, J., Robertson, M., Barr, E., Haber, B., 2015. Efficacy and safety of 8 weeks versus 12 weeks of treatment with grazoprevir (MK-5172) and elbasvir (MK-8742) with or without ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1 mono-infection and HIV/hepatitis C virus co-infection (C-WORTHY): a randomised, open-label phase 2 trial. *Lancet* 385, 1087–1097. doi:10.1016/S0140-6736(14)61793-1

Sulkowski, M.S., Eron, J.J., Wyles, D., Trinh, R., Lalezari, J., Wang, C., Slim, J., Bhatti, L., Gathe, J., Ruane, P.J., Elion, R., Bredeek, F., Brennan, R., Blick, G., Khatri, A., Gibbons, K., Hu, Y.B., Fredrick, L., Schnell, G., Pilot-Matias, T., Tripathi, R., Da Silva-Tillmann, B., McGovern, B., Campbell, A.L., Podsadecki, T., 2015. Ombitasvir, paritaprevir co-dosed with ritonavir, dasabuvir, and ribavirin for hepatitis C in patients co-infected with HIV-1: a randomized trial. *JAMA* 313, 1223–1231. doi:10.1001/jama.2015.1328

Sulkowski, M.S., Gardiner, D.F., Rodriguez-Torres, M., Reddy, K.R., Hassanein, T., Jacobson, I., Lawitz, E., Lok, A.S., Hinestrosa, F., Thuluvath, P.J., Schwartz, H., Nelson, D.R., Everson, G.T., Eley, T., Wind-Rotolo, M., Huang, S.-P., Gao, M., Hernandez, D., McPhee, F., Sherman, D., Hindes, R., Symonds, W., Pasquinelli, C., Grasela, D.M., 2014. Daclatasvir plus Sofosbuvir for Previously Treated or Untreated Chronic HCV Infection. *New England Journal of Medicine* 370, 211–221. doi:10.1056/NEJMoa1306218

Summa, V., Ludmerer, S.W., McCauley, J.A., Fandozzi, C., Burlein, C., Claudio, G., Coleman, P.J., Dimuzio, J.M., Ferrara, M., Di Filippo, M., Gates, A.T., Graham, D.J., Harper, S., Hazuda, D.J., Huang, Q., McHale, C., Monteagudo, E., Pucci, V., Rowley, M., Rudd, M.T., Soriano, A., Stahlhut, M.W., Vacca, J.P., Olsen, D.B., Liverton, N.J., Carroll, S.S., 2012. MK-5172, a selective inhibitor of hepatitis C virus NS3/4a protease with broad activity across genotypes and resistant variants. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 4161–4167. doi:10.1128/AAC.00324-12

Sumpter, R.J., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., Gale, M.J., 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. doi:10.1128/JVI.79.5.2689-2699.2005

Suzuki, T., Ishii, K., Aizaki, H., Wakita, T., 2007. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 1200–1212. doi:10.1016/j.addr.2007.04.014

Syder, A.J., Lee, H., Zeisel, M.B., Grove, J., Soulier, E., Macdonald, J., Chow, S., Chang, J., Baumert, T.F., McKeating, J.A., McKelvy, J., Wong-Staal, F., 2011. Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *J Hepatol* 54, 48–55. doi:10.1016/j.jhep.2010.06.024

T

Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J.-L., Remesy, C., 2005. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J Agric Food Chem* 53, 3902–3908. doi:10.1021/jf050145v

Tamori, A., Enomoto, M., Kawada, N., 2016. *Recent Advances in Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C. Mediators Inflamm* 2016, 6841628. doi:10.1155/2016/6841628

Tan, S., Li, L., Lu, L., Pan, C., Lu, H., Oksov, Y., Tang, X., Jiang, S., Liu, S., 2014. Peptides derived from HIV-1 gp120 co-receptor binding domain form amyloid fibrils and enhance HIV-1 infection. *FEBS Letters* 588, 1515–1522. doi:10.1016/j.febslet.2014.03.016

- Targett-Adams, P., Boulant, S., McLauchlan, J., 2008.** Visualization of Double-Stranded RNA in Cells Supporting Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology* 82, 2182–2195. doi:10.1128/JVI.01565-07
- Taylor, L.E., Foont, J.A., DeLong, A.K., Wurcel, A., Linas, B.P., Chapman, S., Maynard, M.A., Cu-Uvin, S., Mayer, K.H., 2014.** The Spectrum of Undiagnosed Hepatitis C Virus Infection in a US HIV Clinic. *AIDS Patient Care and STDs* 28, 4–9. doi:10.1089/apc.2013.0130
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., Treadaway, J., 2008.** Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein. *PLoS Pathogens* 4, e1000032. doi:10.1371/journal.ppat.1000032
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., Treadaway, J.C., Rice, C.M., 2008.** Identification of Residues Required for RNA Replication in Domains II and III of the Hepatitis C Virus NS5A Protein. *Journal of Virology* 82, 1073–1083. doi:10.1128/JVI.00328-07
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A.E., Rice, C.M., 2004.** The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* 279, 48576–48587. doi:10.1074/jbc.M407787200
- Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., Rice, C.M., 2005.** Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435, 374–379.
- Thakur, V.S., Gupta, K., Gupta, S., 2012.** The chemopreventive and chemotherapeutic potentials of tea polyphenols. *Curr Pharm Biotechnol* 13, 191–199.
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H.C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R.H., Chisari, F.V., 2002.** Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15661–15668. doi:10.1073/pnas.202608299
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.-M., Steiger, C., Ray, S.C., Chisari, F.V., 2001.** Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *The Journal of experimental medicine* 194, 1395–1406.
- Thomas, D.L., Thio, C.L., Martin, M.P., Qi, Y., Ge, D., O’Huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S.I., Alexander, G., Goedert, J.J., Kirk, G.D., Donfield, S.M., Rosen, H.R., Tobler, L.H., Busch, M.P., McHutchison, J.G., Goldstein, D.B., Carrington, M., 2009.** Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461, 798–801. doi:10.1038/nature08463
- Thompson, A.J.V., McHutchison, J.G., 2009.** Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). *J Viral Hepat* 16, 377–387.
- Thrift, A.P., El-Serag, H.B., Kanwal, F., 2017.** Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 122–132.

- Timpe, J.M., Stamataki, Z., Jennings, A., Hu, K., Farquhar, M.J., Harris, H.J., Schwarz, A., Desombere, I., Roels, G.L., Balfe, P., McKeating, J.A., 2007.** Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 47, 17–24. doi:10.1002/hep.21959
- Tong, M.J., El-Farra, N.S., Reikes, A.R., Co, R.L., 1995.** Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *New England Journal of Medicine* 332, 1463–1466.
- Toniutto, P., Fabris, C., Bitetto, D., Fornasiere, E., Rapetti, R., Pirisi, M., 2007.** Valopicitabine dihydrochloride: a specific polymerase inhibitor of hepatitis C virus. *Curr Opin Investig Drugs* 8, 150–158.
- Tran, P.L.C.H.B., Kim, S.-A., Choi, H.S., Yoon, J.-H., Ahn, S.-G., 2010.** Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of HSP70 and HSP90 and exhibits anti-tumor activity in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 10, 276. doi:10.1186/1471-2407-10-276
- Triyatni, M., Saunier, B., Maruvada, P., Davis, A.R., Ulianich, L., Heller, T., Patel, A., Kohn, L.D., Liang, T.J., 2002.** Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. *J Virol* 76, 9335–9344.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., Nomoto, A., 1992.** Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of virology* 66, 1476–1483.

U

- Ullmann, U., Haller, J., Decourt, J.P., Girault, N., Girault, J., Richard-Caudron, A.S., Pineau, B., Weber, P., 2003.** A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. *J Int Med Res* 31, 88–101.
- Urbani, S., Amadei, B., Fisicaro, P., Tola, D., Orlandini, A., Sacchelli, L., Mori, C., Missale, G., Ferrari, C., 2006.** Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* 44, 126–139. doi:10.1002/hep.21242

V

- Valega, M., Lillebo, A.I., Pereira, M.E., Duarte, A.C., Pardal, M.A., 2008.** Long-term effects of mercury in a salt marsh: hysteresis in the distribution of vegetation following recovery from contamination. *Chemosphere* 71, 765–772.

doi:10.1016/j.chemosphere.2007.10.013

- van't Slot, G., Humpf, H.-U., 2009.** Degradation and metabolism of catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), and related compounds by the intestinal microbiota in the pig cecum model. *J Agric Food Chem* 57, 8041–8048. doi:10.1021/jf900458e
- Vanzo, A., Vrhovsek, U., Tramer, F., Mattivi, F., Passamonti, S., 2011.** Exceptionally fast uptake and metabolism of cyanidin 3-glucoside by rat kidneys and liver. *J Nat Prod* 74, 1049–1054. doi:10.1021/np100948a
- Vausselin, T., Calland, N., Belouzard, S., Descamps, V., Douam, F., Helle, F., Francois, C., Lavillette, D., Duverlie, G., Wahid, A., Feneant, L., Cocquerel, L., Guerardel, Y., Wychowski, C., Biot, C., Dubuisson, J., 2013.** The antimalarial ferroquine is an inhibitor of hepatitis C virus. *Hepatology* 58, 86–97. doi:10.1002/hep.26273
- Vausselin, T., Seron, K., Lavie, M., Mesalam, A.A., Lemasson, M., Belouzard, S., Feneant, L., Danneels, A., Rouille, Y., Cocquerel, L., Foquet, L., Rosenberg, A.R., Wychowski, C., Meuleman, P., Melnyk, P., Dubuisson, J., 2016.** Identification of a New Benzimidazole Derivative as an Antiviral against Hepatitis C Virus. *J Virol* 90, 8422–8434. doi:10.1128/JVI.00404-16
- Ververidis, F., Trantas, E., Douglas, C., Vollmer, G., Kretzschmar, G., Panopoulos, N., 2007.** Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnology Journal* 2, 1214–1234. doi:10.1002/biot.200700084
- Vieyres, G., Dubuisson, J., Pietschmann, T., 2014.** Incorporation of Hepatitis C Virus E1 and E2 Glycoproteins: The Keystones on a Peculiar Virion. *Viruses* 6, 1149–1187. doi:10.3390/v6031149
- Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A.H., Dubuisson, J., 2010.** Characterization of the Envelope Glycoproteins Associated with Infectious Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* 84, 10159–10168. doi:10.1128/JVI.01180-10
- Villano, S.A., Vlahov, D., Nelson, K.E., Cohn, S., Thomas, D.L., 1999.** Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology* 29, 908–914. doi:10.1002/hep.510290311
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J., Vu-Dac, N., 2005.** High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* 280, 7793–7799. doi:10.1074/jbc.M411600200
- Voisset, C., Dubuisson, J., 2004.** Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biology of the Cell* 96, 413–413. doi:10.1016/j.biolcel.2004.03.008

W

- Wagoner, J., Morishima, C., Graf, T.N., Oberlies, N.H., Teissier, E., Pécheur, E.-I., Tavis, J.E., Polyak, S.J., 2011.** Differential In Vitro Effects of Intravenous versus Oral Formulations of Silibinin on the HCV Life Cycle and Inflammation. *PLoS ONE* 6, e16464. doi:10.1371/journal.pone.0016464
- Wagoner, J., Negash, A., Kane, O.J., Martinez, L.E., Nahmias, Y., Bourne, N., Owen, D.M., Grove, J., Brimacombe, C., McKeating, J.A., Pécheur, E.-I., Graf, T.N., Oberlies, N.H., Lohmann, V., Cao, F., Tavis, J.E., Polyak, S.J., 2010.** Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology* 51, 1912–1921. doi:10.1002/hep.23587
- Wahid, A., Helle, F., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Dubuisson, J., 2013.** Disulfide bonds in hepatitis C virus glycoprotein E1 control the assembly and entry functions of E2 glycoprotein. *J Virol* 87, 1605–1617. doi:10.1128/JVI.02659-12
- Wahyuni, T.S., Widyawaruyanti, A., Lusida, M.I., Fuad, A., Soetjipto, Fuchino, H., Kawahara, N., Hayashi, Y., Aoki, C., Hotta, H., 2014.** Inhibition of hepatitis C virus replication by chalepin and pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves. *Fitoterapia* 99, 276–283. doi:10.1016/j.fitote.2014.10.011
- Walewski, J.L., Keller, T.R., Stump, D.D., Branch, A.D., 2001.** Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7, 710–721.
- Walker, J.M., Klakotskaia, D., Ajit, D., Weisman, G.A., Wood, W.G., Sun, G.Y., Serfozo, P., Simonyi, A., Schachtman, T.R., 2015.** Beneficial effects of dietary EGCG and voluntary exercise on behavior in an Alzheimer's disease mouse model. *J Alzheimers Dis* 44, 561–572. doi:10.3233/JAD-140981
- Wallace, T.C., Slavin, M., Frankenfeld, C.L., 2016.** Systematic Review of Anthocyanins and Markers of Cardiovascular Disease. *Nutrients* 8. doi:10.3390/nu8010032
- Wang, C., Jia, L., Huang, H., Qiu, D., Valera, L., Huang, X., Sun, J.-H., Nower, P.T., O'Boyle, D.R. 2nd, Gao, M., Fridell, R.A., 2012.** In vitro activity of BMS-790052 on hepatitis C virus genotype 4 NS5A. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 1588–1590. doi:10.1128/AAC.06169-11
- Wang, C., Le, S.Y., Ali, N., Siddiqui, A., 1995.** An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5'noncoding region. *Rna* 1, 526–537.
- Wang, R., Zhou, W., Jiang, X., 2008.** Reaction Kinetics of Degradation and Epimerization of Epigallocatechin Gallate (EGCG) in Aqueous System over a Wide Temperature Range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2694–2701. doi:10.1021/jf0730338

- Wang, Y.-G., Wang, Y.-L., Zhai, H.-F., Liao, Y.-J., Zhang, B., Huang, J.-M., 2012.** Phenanthrenes from *Juncus effusus* with anxiolytic and sedative activities. *Nat Prod Res* 26, 1234–1239. doi:10.1080/14786419.2011.561491
- Watanabe, T., Sugauchi, F., Tanaka, Y., Matsuura, K., Yatsuhashi, H., Murakami, S., Iijima, S., Iio, E., Sugiyama, M., Shimada, T., Kakuni, M., Kohara, M., Mizokami, M., 2013.** Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon-alpha in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut* 62, 1340–1346. doi:10.1136/gutjnl-2012-302553
- Weber, C., Sliva, K., von Rhein, C., Kümmerer, B.M., Schnierle, B.S., 2015.** The green tea catechin, epigallocatechin gallate inhibits chikungunya virus infection. *Antiviral Research* 113, 1–3. doi:10.1016/j.antiviral.2014.11.001
- Wei, F., Liu, S.-K., Liu, X.-Y., Li, Z.-J., Li, B., Zhou, Y.-L., Zhang, H.-Y., Li, Y.-W., 2013.** Meta-analysis: silymarin and its combination therapy for the treatment of chronic hepatitis B. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32, 657–669. doi:10.1007/s10096-012-1789-1
- Weiner, A.J., Kuo, G., Bradley, D.W., Bonino, F., Saracco, G., Lee, C., Rosenblatt, J., Choo, Q.L., Houghton, M., 1990.** Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 335, 1–3.
- Whidby, J., Mateu, G., Scarborough, H., Demeler, B., Grakoui, A., Marcotrigiano, J., 2009.** Blocking Hepatitis C Virus Infection with Recombinant Form of Envelope Protein 2 Ectodomain. *Journal of Virology* 83, 11078–11089. doi:10.1128/JVI.00800-09
- Wiese, M., Berr, F., Lafrenz, M., Porst, H., Oesen, U., 2000.** Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C(genotype 1b) single-source outbreak in germany: A 20-year multicenter study. *Hepatology* 32, 91–96. doi:10.1053/jhep.2000.8169
- Wiley, T.E., McCarthy, M., Breidi, L., McCarthy, M., Layden, T.J., 1998.** Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology* 28, 805–809.
- Williamson, G., Dionisi, F., Renouf, M., 2011.** Flavanols from green tea and phenolic acids from coffee: critical quantitative evaluation of the pharmacokinetic data in humans after consumption of single doses of beverages. *Mol Nutr Food Res* 55, 864–873. doi:10.1002/mnfr.201000631
- Williamson, M., McCormick, T., Nance, C., Shearer, W., 2006.** Epigallocatechin gallate, the main polyphenol in green tea, binds to the T-cell receptor, CD4: Potential for HIV-1 therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118, 1369–1374. doi:10.1016/j.jaci.2006.08.016
- Wilson, E.M., Bial, J., Tarlow, B., Bial, G., Jensen, B., Greiner, D.L., Brehm, M.A., Grompe, M., 2014.** Extensive double humanization of both liver and

hematopoiesis in FRGN mice. *Stem Cell Res* 13, 404–412. doi:10.1016/j.scr.2014.08.006

Wölk, B., Sansonno, D., Kräusslich, H.-G., Dammacco, F., Rice, C.M., Blum, H.E., Moradpour, D., 2000. Subcellular Localization, Stability, and trans-Cleavage Competence of the Hepatitis C Virus NS3-NS4A Complex Expressed in Tetracycline-Regulated Cell Lines. *Journal of virology* 74, 2293–2304.

World Health Organization, World Health Organization, Global Hepatitis Programme, 2014. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection.

Worobey, M., Holmes, E.C., 1999. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol* 80 (Pt 10), 2535–2543. doi:10.1099/0022-1317-80-10-2535

Wu, Y.-H., 2016. Naturally derived anti-hepatitis B virus agents and their mechanism of action. *World Journal of Gastroenterology* 22, 188. doi:10.3748/wjg.v22.i1.188

X

Xiao, F., Fofana, I., Heydmann, L., Barth, H., Soulier, E., Habersetzer, F., Doffoël, M., Bukh, J., Patel, A.H., Zeisel, M.B., Baumert, T.F., 2014. Hepatitis C Virus Cell-Cell Transmission and Resistance to Direct-Acting Antiviral Agents. *PLoS Pathogens* 10, e1004128. doi:10.1371/journal.ppat.1004128

Xiao, X., Yang, Z., Shi, L., Liu, J., Chen, W., 2008. [Antiviral effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on influenza A virus]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 33, 2678–2682.

Xie, Z.C., Riezu-Boj, J.I., Lasarte, J.J., Guillen, J., Su, J.H., Civeira, M.P., Prieto, J., 1998. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 244, 513–520. doi:10.1006/viro.1998.9127

Xu, J., Gu, W., Li, C., Li, X., Xing, G., Li, Y., Song, Y., Zheng, W., 2016. Epigallocatechin gallate inhibits hepatitis B virus via farnesoid X receptor alpha. *Journal of Natural Medicines* 70, 584–591. doi:10.1007/s11418-016-0980-6

Xu, X., Chen, H., Cao, X., Ben, K., 2007. Efficient infection of tree shrew (*Tupaia belangeri*) with hepatitis C virus grown in cell culture or from patient plasma. *Journal of General Virology* 88, 2504–2512. doi:10.1099/vir.0.82878-0

Xu, Y., Martinez, P., Séron, K., Luo, G., Allain, F., Dubuisson, J., Belouzard, S., 2015. Characterization of Hepatitis C Virus Interaction with Heparan Sulfate Proteoglycans. *Journal of Virology* 89, 3846–3858. doi:10.1128/JVI.03647-14

Xu, Z., Choi, J., Yen, T.S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M.J., Ou, J., 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 20, 3840–3848. doi:10.1093/emboj/20.14.3840

Y

- Yamaguchi, K., Honda, M., Ikigai, H., Hara, Y., Shimamura, T., 2002.** Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral research* 53, 19–34.
- Yang, H., Yang, C., Wang, Y., Rhodes, G., Robinson, M., Cheng, G., Qi, X., Mo, H., Tian, Y., Pakdaman, R., Sheng, X.C., Kim, C.U., Delaney, W.E. 4th, 2017.** Preclinical characterization of the novel HCV NS3 protease inhibitor GS-9256. *Antivir Ther.* doi:10.3851/IMP3132
- Yang, Z.-F., Bai, L.-P., Huang, W., Li, X.-Z., Zhao, S.-S., Zhong, N.-S., Jiang, Z.-H., 2014.** Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure–activity relationship analysis. *Fitoterapia* 93, 47–53. doi:10.1016/j.fitote.2013.12.011
- Yao, N., Reichert, P., Taremi, S.S., Prosise, W.W., Weber, P.C., 1999.** Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure* 7, 1353–1363.
- Yi, Q., Wang, P.P., Krahn, M., 2004.** Improving the accuracy of long-term prognostic estimates in hepatitis C virus infection. *Journal of viral hepatitis* 11, 166–174.
- Yu, G.-Y., Lee, K.-J., Gao, L., Lai, M.M.C., 2006.** Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol* 80, 6013–6023. doi:10.1128/JVI.00053-06
- Yun, B., Oh, S., Song, M., Hong, Y.-S., Park, S., Park, D.-J., Griffiths, M.W., Oh, S., 2015.** Inhibitory Effect of Epigallocatechin Gallate on the Virulence of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027. *J Food Sci* 80, M2925-2931. doi:10.1111/1750-3841.13145

Z

- Zeisel, M.B., Felmlee, D.J., Baumert, T.F., 2013.** Hepatitis C virus entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 369, 87–112. doi:10.1007/978-3-642-27340-7_4
- Zeisel, M.B., Koutsoudakis, G., Schnober, E.K., Haberstroh, A., Blum, H.E., Cosset, F.-L., Wakita, T., Jaeck, D., Doeffoel, M., Royer, C., Soulier, E., Schvoerer, E., Schuster, C., Stoll-Keller, F., Bartenschlager, R., Pietschmann, T., Barth, H., Baumert, T.F., 2007.** Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 46, 1722–1731. doi:10.1002/hep.21994

- Zeuzem, S., Buggisch, P., Agarwal, K., Marcellin, P., Sereni, D., Klinker, H., Moreno, C., Zarski, J.-P., Horsmans, Y., Mo, H., Arterburn, S., Knox, S., Oldach, D., McHutchison, J.G., Manns, M.P., Foster, G.R., 2012.** The protease inhibitor, GS-9256, and non-nucleoside polymerase inhibitor tegobuvir alone, with ribavirin, or pegylated interferon plus ribavirin in hepatitis C. *Hepatology* 55, 749–758. doi:10.1002/hep.24744
- Zeuzem, S., Feinman, S.V., Rasenack, J., Heathcote, E.J., Lai, M.-Y., Gane, E., O’Grady, J., Reichen, J., Diago, M., Lin, A., others, 2000.** Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine* 343, 1666–1672.
- Zeuzem, S., Lee, J., Herrmann, E., Fricke, J., Neumann, A.U., Modi, M., Colucci, G., Roth, W.K., 2001.** Viral kinetics in patients with chronic hepatitis C treated with standard or peginterferon α 2a. *Gastroenterology* 120, 1438–1447. doi:10.1053/gast.2001.24006
- Zhang, H., Rothwangl, K., Mesecar, A.D., Sabahi, A., Rong, L., Fong, H.H.S., 2009.** Lamiridosins, Hepatitis C Virus Entry Inhibitors from *Lamium album*. *Journal of Natural Products* 72, 2158–2162. doi:10.1021/np900549e
- Zhang, J., Nguyen, D., Hu, K.-Q., 2016.** Chronic Hepatitis C Virus Infection: A Review of Current Direct-Acting Antiviral Treatment Strategies. *N Am J Med Sci (Boston)* 9, 47–54.
- Zhang, N., Liu, Z., Han, Q., Chen, J., Lou, S., Qiu, J., Zhang, G., 2009.** Inhibition of bovine viral diarrhoea virus in vitro by xanthohumol: Comparisons with ribavirin and interferon- α and implications for the development of anti-hepatitis C virus agents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 38, 332–340. doi:10.1016/j.ejps.2009.08.005
- Zhao, C., Liu, S., Li, C., Yang, L., Zu, Y., 2014.** In Vitro Evaluation of the Antiviral Activity of the Synthetic Epigallocatechin Gallate Analog-Epigallocatechin Gallate (EGCG) Palmitate against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Viruses* 6, 938–950. doi:10.3390/v6020938
- Zhao, H., Zhu, W., Jia, L., Sun, X., Chen, G., Zhao, X., Li, X., Meng, X., Kong, L., Xing, L., Yu, J., 2016.** Phase I study of topical epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in patients with breast cancer receiving adjuvant radiotherapy. *Br J Radiol* 89, 20150665. doi:10.1259/bjr.20150665
- Zhao, M., Jiang, J., Zheng, R., Pearl, H., Dickinson, D., Fu, B., Hsu, S., 2012.** A proprietary topical preparation containing EGCG-stearate and glycerin with inhibitory effects on herpes simplex virus: case study. *Inflamm Allergy Drug Targets* 11, 364–368.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M., Deng, H., 2007.** Claudin-6 and Claudin-9 Function as Additional Coreceptors for Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* 81, 12465–12471. doi:10.1128/JVI.01457-07

- Zhong, L., Hu, J., Shu, W., Gao, B., Xiong, S., 2015.** Epigallocatechin-3-gallate opposes HBV-induced incomplete autophagy by enhancing lysosomal acidification, which is unfavorable for HBV replication. *Cell Death and Disease* 6, e1770. doi:10.1038/cddis.2015.136
- Zhou, Y., Tang, J., Du, Y., Ding, J., Liu, J.-Y., 2016.** The green tea polyphenol EGCG potentiates the antiproliferative activity of sunitinib in human cancer cells. *Tumour Biol.* doi:10.1007/s13277-015-4719-x
- Zhu, Y., Ling, W., Guo, H., Song, F., Ye, Q., Zou, T., Li, D., Zhang, Y., Li, G., Xiao, Y., Liu, F., Li, Z., Shi, Z., Yang, Y., 2013.** Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: A randomized controlled trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 23, 843–849. doi:10.1016/j.numecd.2012.06.005
- Zuo, G., Li, Z., Chen, L., Xu, X., 2007.** Activity of compounds from Chinese herbal medicine *Rhodiola kirilowii* (Regel) Maxim against HCV NS3 serine protease. *Antiviral Research* 76, 86–92. doi:10.1016/j.antiviral.2007.06.001

Annexe

Principe du fractionnement bio-guidé des rhizomes de *J. maritimus*

Le fractionnement bio-guidé d'extraits de plantes a pour objectif d'isoler et d'identifier les principes actifs ayant une activité antivirale contre le VHC.

Les rhizomes de *J. maritimus* ont été collectés sur la zone côtière Nord de la Tunisie en octobre 2013. Ils ont été séchés à 25°C pendant 1 semaine avant d'être broyés. L'extraction des composés bioactifs est réalisée en plusieurs étapes. Une première extraction est réalisée par trois macérations successives au méthanol (1x24h et 2x48h). Après chaque macération, l'ensemble des rhizomes est filtré sur du papier filtre, puis les trois filtrats issus des trois macérations sont concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait concentré est dilué dans de l'eau distillée, avant d'être lyophilisé. La poudre obtenue après lyophilisation est conservée à 4°C et correspond à l'extrait brut.

Un fractionnement liquide-liquide avec trois solvants différents est ensuite effectué afin de séparer les composés selon leurs propriétés biochimiques, polaires ou apolaires. Le fractionnement liquide-liquide est réalisé dans des ampoules à décanter. Les trois solvants utilisés sont le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, et un mélange eau-méthanol. Pour chaque solvant, la phase organique est prélevée. Ce fractionnement liquide est réalisé plusieurs fois jusqu'à épuisement. L'ensemble des fractions collectées est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif puis évaporé au *Speedvac*.

La technique de purification des différents composés présents dans les différentes fractions est la chromatographie de partage centrifuge. C'est une technique de chromatographie liquide-liquide. Les composés sont séparés selon leur différence d'affinité pour deux liquides différents. L'une des deux phases est maintenue dans la colonne à l'aide de la force centrifuge tandis que la seconde est pompée en permanence à travers la phase stationnaire. La phase mobile va se mélanger dans un premier temps avec la phase stationnaire. Les deux phases étant non-miscibles, il y a séparation des différentes molécules selon leur affinité pour ces deux phases. Au bout d'un certain temps, la phase mobile va décanter en surface et va pouvoir être aspirée. Ces différentes étapes peuvent être répétées un certain nombre de fois jusqu'à épuisement. L'avantage

de cette technique est l'absence de phase solide permettant ainsi d'avoir un rendement très élevé car quasiment tout l'échantillon est récupéré à la fin de l'expérience.

L'identification des composés actifs est réalisée avec la technique de chromatographie liquide à haute pression (HPLC : « *High Performance Liquid Chromatography* »). Le chromatogramme obtenu permet d'identifier et d'isoler les composés majoritaires de la fraction. La structure des composés jugés les plus intéressants est ensuite déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN).

L'ensemble de ces étapes de fractionnement a été réalisé par Ramla Shali, étudiante en thèse dans le laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Lille sous la direction du Dr. Céline Rivière.

Le processus d'extraction et de purification des composés est long et la quantité extraite est faible comme le montre le schéma ci-dessous :

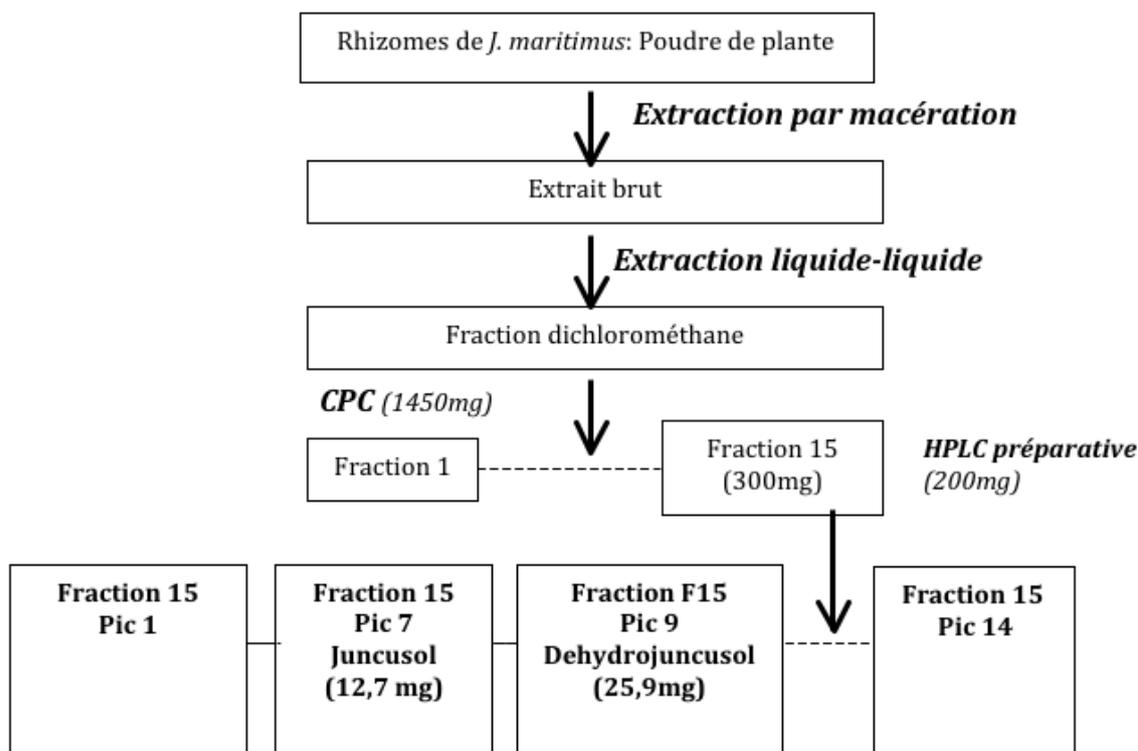


Figure 33 : Processus d'extraction et de purification du dehydrojuncusol

La quantité de dehydrojuncusol obtenue à la fin du processus d'extraction est d'environ 25,9mg. Une partie de cet extrait, environ 3 mg, est utilisée pour réaliser la détermination de la structure de la molécule par RMN et une autre partie est utilisée pour des tests bactériens. La quantité disponible pour les tests virologiques est d'environ 6 mg. Au fur et à mesure de nos expériences, nous nous sommes rendus compte que le dehydrojuncusol perdait son activité quand il reste plus de 3 mois suspendu dans le DMSO et conservé à -20°C. L'ensemble de ces conditions explique pourquoi nous avons travaillé avec la fraction dichlorométhane afin de caractériser l'effet de l'extrait de *J. maritimus*, plutôt que le dehydrojuncusol, dont nous disposions en plus faible quantité. La fraction dichlorométhane semble se conserver plus longtemps resuspendue dans le DMSO et conservée à -20°C. Pour pouvoir réaliser plus d'expériences avec le dehydrojuncusol, nous avons contacté une équipe de chimistes afin de savoir si ce composé pouvait être facilement synthétisé. Il semble que le composé soit relativement difficile à obtenir par synthèse chimique et demande plusieurs mois de travail. Dans le cadre de ce projet, nous n'avons pas pu démarrer de collaboration avec l'équipe de chimistes, mais une collaboration pourra être engagée par la suite.

Liste des publications

- ✓ Noémie Calland*, **Marie-Emmanuelle Sahuc***, Sandrine Belouzard, Véronique Pène, Pierre Bonnafous, Ahmed Atef Mesalam, Gaspard Deloison, Véronique Descamps, Sevser Sahpaz, Czeslaw Wychowski, Olivier Lambert, Priscille Brodin, Gilles Duverlie, Philip Meuleman, Arielle R. Rosenberg, Jean Dubuisson, Yves Rouillé, Karin Séron. **Polyphenols Inhibit Hepatitis C Virus Entry by a New Mechanism of Action** J Virol (2015) 89:10053–10063. *co- first author

- ✓ **Sahuc ME**, Sahli R, Sahpaz S, Rouillé Y, Rivière C, Séron K **Dehydrojuncusol extracted from Juncus maritimus is a new inhibitor of HCV replication en preparation**

- ✓ Séron Karin, **Sahuc ME**, Rouillé Y **Natural products and hepatitis C**

- ✓ Rashed K, **Sahuc ME**, Deloison G, Calland N, Brodin P, Rouillé Y, Séron K. **Potent antiviral activity of Solanum rantonnetii and the isolated compounds against hepatitis C virus in vitro.** Journal of Functional Foods (2014). 11, 185-191

- ✓ Galani BR, **Sahuc ME**, Njayou FN, Deloison G, Mkounga P, Feudjou WF, Brodin P, Rouillé Y, Nkengfack AE, Moundipa PF, Séron K. **Plant extracts from Cameroonian medicinal plants strongly inhibit hepatitis C virus infection in vitro.** Front Microbiol (2015), 6:488

- ✓ Galani BR, **Sahuc ME**, Sass G, Njayou FN, Loscher C, Mkounga P, Deloison G, Brodin P, Rouillé Y, Tiegs G, Séron K, Moundipa PF. **Khaya grandifoliola C.DC: a potential source of active ingredients against hepatitis C virus in vitro** Arch Virol (2016) 161:1169–1181

- ✓ Sahli, R., Riviere, C., **Sahuc, M.E.**, Abderrazak, S., Samaillie, J., Roumy, V., Hennebelle, T., Rouille, Y., Seron, K., Sahpaz, S., Ksouri, R., 2016. A new inhibitor of hepatitis C virus replication from Juncus maritimus, a Tunisian extremophile plant. Planta Med 81, S1–S381. doi:10.1055/s-0036-1596529

- ✓ Sahli R, Rivière C, Neut C, Bero J, **Sahuc ME**, Smaoui A, Beaufay C,; Roumy v, Hennebelle T; Rouillé Y, Quetin-Leclercq J, Seron K, Ksouri R, Sahpaz S. **An ecological approach to discover new bioactive extracts and products: The case of extremophile plants** Journal of Pharmacy and Pharmacology (2016) *en révision*

- ✓ M Bamba, S Bordage, **ME Sahuc**, J Samaille, C Neut, A Zamble, FT Bi, K Seron, S Sahpaz. **Antiviral and antibacterial effects of 16 plants used in Ivorian traditional medicine.** *Planta Med* 2016; 82(S 01): S1-S381 DOI: 10.1055/s-0036-1596549