



HAL
open science

Détournement du métabolisme lipidique hépatocytaire par le virus de l'hépatite C : exemple de la lysophosphatidylcholine acyltransférase 1

Matthieu Lemasson

► **To cite this version:**

Matthieu Lemasson. Détournement du métabolisme lipidique hépatocytaire par le virus de l'hépatite C : exemple de la lysophosphatidylcholine acyltransférase 1. Virologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB225 . tel-03829108

HAL Id: tel-03829108

<https://theses.hal.science/tel-03829108>

Submitted on 25 Oct 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes

Ecole doctorale BioSPC ED n° 562

Département : Biologie Cellulaire et Moléculaire, Physiologie, Physiopathologie (BCMPP)

Laboratoire EA 4474 - «Virologie de l'Hépatite C »

Détournement du métabolisme lipidique hépatocytaire par le virus de l'hépatite C : exemple de la lysophosphatidylcholine acyltransférase 1

Présenté par Matthieu LEMASSON

Afin d'obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris Descartes

Spécialité : Virologie

Thèse dirigée par le **Dr. Arielle ROSENBERG**

Présentée et soutenue publiquement le 25 novembre 2015 à l'Institut Cochin

Devant le jury composé de :

Pr. Pierre-Emmanuel CECCALDI	Président du jury
Dr. Catherine SCHUSTER	Rapporteur
Dr. Hervé LERAT	Rapporteur
Dr. Sophie CLEMENT-LEBOUBE	Examinatrice
Dr. Arielle ROSENBERG	Directrice de thèse

*« Le savant le sait bien lui, que sans la science
l'Homme ne serait jamais qu'un stupide animal
sotttement occupé à s'adonner aux vains plaisirs de l'amour
dans les folles prairies de l'insouciance.
Alors que la science, et la science seule
a su lui apporter patiemment au fil des siècles...
le parcmètre automatique et l'horloge pointeuse
sans lesquelles il n'est pas de bonheur terrestre possible !
Et s'il n'y avait pas la science,
malheureux cloportes suintants d'ingratitude aveugle et d'ignorance crasse,
s'il n'y avait pas la Science !
Combien d'entre nous pourrait profiter de leur cancer pendant plus de cinq ans ? »*

Pierre DESPROGES

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse :

- Les Docteurs Catherine SCHUSTER et Hervé LERAT qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit et d'avoir considéré mes travaux de thèse en peu de temps.
- Le Docteur Sophie CLEMENT-LEBOUBE pour avoir accepté d'être examinateur
- Le Professeur Pierre-Emmanuel CECCALDI d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de ma thèse

Je souhaite également remercier chaleureusement et exprimer toute ma gratitude au Docteur Arielle ROSENBERG, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et soutenu durant toutes ces années.

Résumé

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) perturbe le métabolisme lipidique de son hôte. En effet, les particules virales sont hétérogènes mais les plus infectieuses sont celles retrouvées aux plus basses densités du fait de leur association avec des composants des lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les lipoprotéines riches en triglycérides (TG) et contenant l'apolipoprotéine B (ApoB) produites par les hépatocytes ; ces complexes sont appelés lipo-viro-particules (LVP). De plus, les malades présentent fréquemment une stéatose hépatique, c'est-à-dire une accumulation de TG dans les gouttelettes lipidiques (GL) des hépatocytes, qui stockent les lipides neutres au sein d'une monocouche de phospholipides essentiellement constitués de phosphatidylcholine. Notre hypothèse de travail est que le VHC usurpe le métabolisme lipidique des hépatocytes au profit de la production de LVP. Une étude publiée au début de mon travail de thèse a révélé que la lysophosphatidylcholine acyltransférase 1 (LPCAT1) catalyse la synthèse de phosphatidylcholine directement à la surface des GL, avec pour conséquence un remodelage de ces dernières. Cela nous a incités à examiner si cette voie est détournée par le VHC, puis à déterminer le rôle de LPCAT1 à la fois dans le métabolisme lipidique des hépatocytes et dans le cycle infectieux du VHC.

Lors de l'infection *de novo* par le VHC, les cellules de la lignée hépatocytaire Huh-7.5.1 et les hépatocytes humains en culture primaire (HHP) présentaient une diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine LPCAT1, suggérant une régulation transcriptionnelle de cette enzyme par le VHC. L'extinction de LPCAT1 en cellules Huh-7.5.1, infectées ou non, induisait une diminution du nombre des GL accompagnée d'une augmentation de leur taille, suggérant une fusion des GL, ainsi qu'une accumulation intracellulaire de TG à l'état d'équilibre, donc une stéatose. La sécrétion des TG néosynthétisés et de l'ApoB était également augmentée, témoignant d'une augmentation de la production de VLDL. Dans les cellules Huh-7.5.1 et les HHP infectés par le VHC, l'extinction de LPCAT1 n'affectait pas la réplication du génome viral mais augmentait la production de virus infectieux, indiquant un effet sur la morphogénèse du VHC. De plus, les particules virales produites avaient une infectiosité spécifique supérieure corrélant avec une densité plus basse, des propriétés caractéristiques des LVP.

En conclusion, le VHC diminue l'expression de LPCAT1, une enzyme associée aux GL des hépatocytes, ce qui apparaît comme une stratégie virale permettant d'augmenter le contenu en TG, et de là l'infectiosité spécifique des particules virales néoformées. Cibler la voie du métabolisme lipidique contrôlée par LPCAT1 représenterait une approche thérapeutique intéressante, car susceptible de réduire à la fois le titre viral et la stéatose hépatique.

Mots clefs : virus de l'hépatite C, lysophosphatidylcholine acyltransférase 1, métabolisme lipidique du foie, morphogénèse virale, infectiosité spécifique.

Table des matières

Table des matières	11
Table des illustrations	14
Abréviations	15
Préambule	19
Introduction.....	20
Chapitre 1 : Le métabolisme lipidique hépatocytaire	20
I. Principaux lipides hépatiques et leurs voies de synthèse.....	20
I.1. Triacylglycérols.....	21
I.1.A. Lipogenèse	21
I.1.B. Diacylglycérol acyltransférases	21
I.1.C. Régulation de la lipogenèse.....	23
I.2. Synthèse des phospholipides	24
I.2.A. Voie <i>de novo</i>	25
I.2.B. Cycle de Lands	25
I.2.C. Lysophosphatidylcholine acyltransférases	26
I.2.C.a. Classification.....	26
I.2.C.b. Lysophosphatidylcholine acyltransférase 1.....	27
I.3. Autres principaux lipides hépatiques.....	28
I.3.A. Sphingolipides	28
I.3.B. Cholestérol	28
II. Gouttelettes lipidiques.....	29
II.1. Gouttelettes lipidiques cytosoliques.....	29
II.1.A. Structure	29
II.1.B. Biogenèse.....	30
II.1.C. Protéines associées et leurs fonctions.....	32
II.1.C.a. La Famille des périlipines.....	32
II.1.C.b. Les Rabs.....	35
II.1.D. Devenir des gouttelettes lipidiques cytosoliques	36
II.1.D.a. Fusion des gouttelettes lipidiques cytosoliques.....	36
II.1.D.b. Catabolisme des gouttelettes lipidiques cytosoliques	38
II.2. Gouttelettes lipidiques luminales	39
III. La biogenèse des VLDLs	41
III.1. Lipidation de la pré-VLDL.....	41
III.2. Destin de la pré-VLDL.....	44
III.3. Maturation au Golgi.....	44
Chapitre 2 : Le virus de l'hépatite C.....	46

I.	L'hépatite C.....	46
I.1.	Epidémiologie.....	46
I.2.	Transmission	47
I.3.	Histoire naturelle de la maladie	48
I.4.	Variabilité génétique du virus.....	49
I.5.	Dépistage.....	51
I.6.	Traitements	51
I.6.A.	Evolution des traitements antiviraux.....	51
I.6.B.	Dernière avancée : les antiviraux à action spécifique	52
I.6.C.	Vers un vaccin	53
II.	Le Virus de l'Hépatite C.....	54
II.1.	Structures des particules virales.....	54
II.1.A.	Structure théorique du virus de l'hépatite C.....	54
II.1.B.	Structure du génome.....	55
II.1.B.a.	Région 5' non codante.....	56
II.1.B.b.	Région 3' non codante.....	57
II.1.B.c.	Région codante.....	57
II.1.C.	Les différentes particules virales	57
II.1.C.a.	Particules virales in vivo	57
II.1.C.b.	Particules virales in vitro.....	59
II.2.	Cycle viral.....	60
II.2.A.	Entrée virale	61
II.2.A.a.	Attachement et facteurs cellulaires impliqués.....	61
II.2.A.a.i.	Protéoglycanes à héparane sulfate.....	61
II.2.A.a.ii.	Récepteur aux LDL cholestérol	63
II.2.A.a.iii.	Récepteur scavenger de classe B type 1	64
II.2.A.a.iv.	CD81	66
II.2.A.a.v.	Récepteur au facteur de croissance épidermique	67
II.2.A.b.	Internalisation et facteurs cellulaires impliqués.....	68
II.2.A.b.i.	Claudine 1.....	68
II.2.A.b.ii.	Occludine.....	69
II.2.A.b.iii.	Récepteur à la transferrine.....	70
II.2.A.c.	Transmission de cellule à cellule	70
II.2.A.d.	Fusion.....	71
II.2.B.	Traduction de la polyprotéine virale	72
II.2.C.	Maturation de la polyprotéine virale.....	73
II.2.C.a.	Protéine de Capside	74
II.2.C.b.	Protéine F.....	76
II.2.C.c.	Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2.....	76
II.2.C.d.	Protéine virale p7	77

II.2.C.e. NS2.....	78
II.2.C.f. NS3 / NS4A.....	79
II.2.C.g. NS4B.....	80
II.2.C.h. NS5A.....	81
II.2.C.i. NS5B.....	82
II.2.D. Réplication du génome viral	83
II.2.D.a. Le « membranous web »	83
II.2.D.b. Autres acteurs cruciaux de la réplication virale : les lipides	85
II.2.E. Assemblage des particules virales	88
II.2.E.a. Etapes précoces de l'assemblage viral	89
II.2.E.b. Etapes tardives de l'assemblage viral	91
II.2.F. Sécrétion des particules virales	92
II.2.F.a. Maturation	92
II.2.F.b. Sécrétion.....	94
II.3. Les modèles d'infection	96
II.3.A. Les modèles d'infection <i>in vivo</i>	96
II.3.A.a. Modèles primates	96
II.3.A.b. Modèles murins.....	96
II.3.B. Les modèles cellulaires	97
II.3.B.a. L'évolution des modèles jusqu'en 2005	97
II.3.B.b. Le système de culture cellulaire du VHC (VHCcc).....	98
II.3.B.c. Cultures d'hépatocytes humains primaires	100
III. VHC et stéatose hépatique.....	102
III.1. Observations cliniques.....	102
III.1.A. Protéine de capside et stéatose.....	103
III.2. Mécanismes d'induction	104
Résultats.....	107
Discussion.....	141
Conclusion générale	149
Annexes	195
Références.....	150

Table des illustrations

Figure 1 : Voies de synthèse des triacylglycérols et des phospholipides	22
Figure 2 : Régulation de la lipogenèse en condition hyperglycémiant.....	23
Figure 3 : Composition des gouttelettes lipidiques cytosoliques	29
Figure 4 : Modèles de « bourgeonnement » des gouttelettes lipidiques cytosoliques	31
Figure 5 : Répartitions des périlipines à la surface des gouttelettes lipidiques cytosoliques en fonction de leur taille ou de l'avancement de la stéatose.....	34
Figure 6 : Mécanismes de fusion des gouttelettes lipidiques cytosoliques	37
Figure 7 : Biogenèse des gouttelettes lipidiques lumineales	40
Figure 8 : Composition des VLDLs	41
Figure 9 : Biogenèse des VLDLs	43
Figure 10 : Maturation et sécrétion des VLDLs	45
Figure 11 : Prévalence mondiale du virus de l'hépatite C par pays en 2014	46
Figure 12 : Histoire naturelle de l'infection par le VHC.....	49
Figure 13 : Répartition des génotypes du VHC dans les régions du monde	50
Figure 14 : Structure putative du VHC	55
Figure 15 : Organisation génomique du VHC	56
Figure 16 : Particules virales circulantes dans le sang des patients.....	58
Figure 17 : Cycle viral du VHC	61
Figure 18 : Entrée virale	62
Figure 19 : Initiation de la traduction du VHC	73
Figure 20 : Topologie des protéines virales matures et leur(s) fonction(s).....	74
Figure 21 : Réseau d'interactions des protéines du VHC	78
Figure 22 : Visualisation du « Membranous web » par microscopie électronique.....	84
Figure 23 : Hypothèses sur la formation des DMVs.....	85
Figure 24 : Réplication et morphogenèse virale	89
Figure 25 : Modèles de morphogenèse des lipo-viro-particules.....	93
Figure 26 : Mécanismes d'induction de la stéatose par le VHC	104
Figure 27 : Impacts du remodelage et de la diversité des PLs membranaires.....	142

Abréviations

a.a.	Acide aminé
Ac	Anticorps
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ACL	Adénosine triphosphate citrate lyase
ACSL3	« Long chain acyl-CoA synthetase 3 »
Acyl-CoA	Acyl-coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADRP	« Adipocyte differentiation-related protein »
AG	Acide gras
AGPAT	1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransférases
Akt	Protéine kinase B
AP	Acide phosphatidique
Apo	Apolipoprotéine
ARF1	Facteur 1 d'ADP-ribosylation
ARFP	« alternative ribosomal frameshift protein »
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
ATGL	« Adipose triglyceride lipase »
BiP	« Binding immunoglobulin Protein »
C	Capside
C-	Carboxy-
CCT	CTP-cytidyltransférase
CD81	« Cluster of differentiation 81 »
CDP	Cytidine diphosphate-phosphocholine
CERT	Protéine de transfert de céramide (« ceramide transfer protein »)
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CIDE	« Cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like effector »
CLDN-1	Claudine 1
CMP	Cytidine monophosphate-phosphocholine
CPT	CDP-choline:1, 2-DAG cholinephosphotransférase
CTP	Cytidine triphosphate-phosphocholine
CYP	Cytochrome P450
DAA	Antiviraux à action direct (<i>direct-acting antiviral</i>)
DAG	Diacylglycérol
DDX3	« DEAD box polypeptide 3 »
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DMV	Vésicules à double membranes
E1	Glycoprotéine d'enveloppe E1 du virus de l'hépatite C
E2	Glycoprotéine d'enveloppe E2 du virus de l'hépatite C

EGFR	Récepteur au facteur de croissance épidermique
eIF3	« Eukaryotic translation initiation factor »
ELISA	Test d'adsorption immunologique couplée à une enzyme (« enzyme-linked immunosorbent assay »)
ERAD	Dégradation associée au RE
ERK2	« Extracellular signal-regulated kinase 2 »
FAP	Facteur d'activation plaquettaire
FAPP2	« Four-phosphate adaptator 2 »
FAS	« Fatty acid synthase »
Fox	« Forkhead box protein »
GLC	Gouttelette lipidique cytosolique
GLL	Gouttelette lipidique luminale
GPAT	Glycérol phosphate acyltransférase
HDL	Lipoprotéine de haute densité (« high density lipoprotein »)
HepG2	Lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain
HHP	Hépatocytes humains primaires
HMG-CoA	Hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA
HSPG	Protéoglycane à héparane sulfate
HSL	Lipase sensible aux hormones (« hormone-sensitive lipase »)
Huh-7	Lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain (« human hepatocarcinoma »)
HVR	Région hyper variable (« hyper variable region »)
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire
IF	Immunofluorescence
IFN α	Interféron alpha
IRES	Site interne de fixation du ribosome (« internal ribosome entry site »)
JFH	Hépatite fulminante japonaise
Kb	kilobases
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoprotéine de faible densité (« low density lipoprotein »)
LDL-R	Récepteur du cholestérol des LDLs
LDLox	Lipoprotéine de faible densité oxydée
LEL	« Large extracellular loop »
LP	Lipoprotéine
LPCAT	Lysophosphatidylcholine acyltransférase
LPEAT2	Lsophosphatidyléthanolamine acyltransférase 2
LPK	« Liver pyruvate kinase »
LPL	Lipoprotéine lipase
LVP	Lipo-viro-particule
MALD	« Microsome-associated lumenal lipid droplets »
MAVS	« Mitochondrial antiviral-signaling protein »
MCAD	« Medium-chain-acyl-deshydrogenase »
miRNA	microARN

MBOAT	« Membrane bound O-acyltransferase »
miRNA	Micro ARN interférant
MOI	Multiplicité d'infection (« multiplicity of infection »), ratio du nombre de virus sur le nombre de cellules
MTP	« Microsomal triglyceride transfer protein »
MW	« Membranous web »
N-	Amino-
NAFLD	Stéatose hépatique non alcoolique (« nonalcoholic fatty liver disease »)
NASH	Stéato-hépatite non alcoolique (« nonalcoholic stéatohépatitis »)
NPC1L1	Récepteur de Nieman-Pick C1-like1
NS	Non-structurale
OCLN	Occludine
OSBP	« Oxysterol-binding protein »
PC	Phosphatidylcholine
PGC-1 α	« Peroxisome-proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α »
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI4KA	Phosphatidylinositol-4 kinase-III α
PKA	Protéine kinase A
pH	Potentiel hydrogène
PL	Phospholipides
PLA	Phospholipase A
PLIN	Périlipine
PLTP	Protéine de transfert des phospholipides
PPAR	« Peroxisome proliferator activated receptor »
PSTPIP2	« Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 »
PTEN	« Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 »
Rab	« Ras superfamily of GTPases »
RE	Réticulum endoplasmique
RIBA	« Recombinant immunoblot assay »
SCAD	« Short-chain-acyl-deshydrogenase »
SCD-1	Stéaroyl-CoA désaturase-1
shRNA	« short hairpin RNA »
siRNA	« small interfering RNA »
SP	Signal peptidase
SPP	Signal peptide-peptidase
SR-B1	Récepteur « scavenger » de classe B type 1
SNARE	« Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor »
SREBP-1	« Sterol regulatory element binding protein »
SNAP23	« Synaptosomal-associated protein of 23 kDa »
SVF	Sérum de veau fœtal
TAG	Triacylglycérol
TIP47	« Tail-interacting protein 47 »

TRIF	« TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β »
TrF1	Récepteur à la transferrine 1
TROD	Tests rapides d'orientation diagnostic
TRL	Lipoprotéine riche en triglycérides (« triglycerid-rich lipoprotein »)
uff	unité formant foyer
UPR	« Unfolded protein response »
VAMP	« Vesicle-associated membrane protein 4 »
VHC	Virus de l'hépatite C
VHCcc	Particules virales du VHC produites en culture de lignée cellulaire (« HCVcc »)
VHCpc	Particules virales produites en cultures primaires d'hépatocytes humains (« HCVpc »)
VHCser	Particules virales de sérum de patients infectés
VHCpp	Pseudo-particule du VHC
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité (<i>very low density lipoprotein</i>)
VTV	Vésicule de transport des VLDLs
WB	Western blot
wt	Type sauvage (<i>wild type</i>)

Préambule

Au fil du temps et des recherches, la définition du vivant a constamment évolué, allant de l'être pensant, pour s'affiner jusqu'à l'infiniment petit, et est délimitée aujourd'hui à la capacité de pouvoir se répliquer de façon autonome. Les virus représentent la frontière actuelle entre le vivant et le non-vivant, car capables de transmettre leur matériel génétique à leur descendance, tout en dépendant de la machinerie cellulaire de l'hôte. Les virus sont donc des parasites intracellulaires obligatoires, mais dotés d'une structure et d'un génome propres, les caractérisant. C'est d'ailleurs grâce à son génome que le virus de l'hépatite C (VHC) a pu être identifié en 1989. En effet, ce virus fut le premier à être identifié par des techniques de biologie moléculaire, grâce aux progrès dans ce domaine, et en dépit de l'absence de systèmes de culture du virus (Choo QL et al., 1989). L'hépatite C était initialement suspectée lors du diagnostic d'une hépatite non due aux virus de l'hépatite A ou B, d'où son ancienne dénomination d'hépatite « non-A non-B ».

La caractérisation des particules virales circulantes dans le sang des patients a montré que les plus infectieuses sont associées aux lipoprotéines de très faible densité (VLDL) (Bradley D et al., 1991; Hijikata M et al., 1993b; Andre P et al., 2002). Nous verrons dans cette thèse que le VHC perturbe le métabolisme lipidique des hépatocytes et notamment usurpe la voie de production des VLDLs à ses fins. L'introduction de ce manuscrit s'efforcera donc dans un premier temps de détailler le métabolisme lipidique des hépatocytes, en se focalisant sur les triglycérides (TAG), le cholestérol, les gouttelettes lipidiques ainsi que les VLDLs, tous impliqués dans le cycle infectieux du VHC, qui sera décrit dans un second temps en insistant sur les relations du virus avec les lipides de son hôte. En revanche, les autres lipoprotéines ne seront pas détaillées, car non synthétisées par le foie à l'exception des lipoprotéines de forte densité (HDL). D'excellentes revues sont publiées sur ces HDL, faisant état de leur structure ainsi que de leur métabolisme (Gursky O, 2015; Kontush A et al., 2015; Zannis VI et al., 2015).

Introduction

Chapitre 1 : Le métabolisme lipidique hépatocytaire

I. Principaux lipides hépatiques et leurs voies de synthèse

Les cellules de l'organisme ont un besoin constant d'énergie afin de pouvoir effectuer leurs réactions, et donc leurs fonctions. Cette énergie provient primitivement des apports extérieurs lors de la digestion des nutriments, et est régulée afin d'assurer un apport constant aux cellules *via* la circulation sanguine. Les principaux vecteurs de cette énergie sont les triacylglycérols (TAGs) dont le pouvoir énergétique est 1000 fois supérieur à celui de l'ATP, suivis du glucose. Si ce dernier est directement absorbé par les entérocytes, les TAGs doivent être hydrolysés par des lipases avant d'être absorbés. Le glucose peut directement être largué dans le système lymphatique, dont la majorité sera captée par le foie. En revanche, les lipides sont transportés dans des chylomicrons, particules d'extrêmement faible densité possédant des apolipoprotéines (Apo) à leur surface dont l'ApoB-48 (Lieberman M *et al.*, 2009).

Les chylomicrons gagnent la circulation sanguine via le système lymphatique, mais ne peuvent pas être délivrés directement aux organes. Les lipoprotéines de haute densité (HDL) transfèrent d'abord aux chylomicrons une molécule d'ApoE et d'ApoCII. L'ApoCII permet d'activer une enzyme produite par les cellules musculaires et adipeuses, la lipoprotéine lipase (LPL) plasmatique. Située à la surface des cellules endothéliales des capillaires, la LPL hydrolyse la majeure partie des TAGs en glycérol et acides gras (AG) libres, les libérant dans la circulation sanguine. Les AG libres peuvent alors être captés par les tissus, principalement les muscles et le tissu adipeux, et dans une moindre mesure retourner dans le plasma par association avec l'albumine sérique. Le glycérol, quant à lui, peut circuler librement dans le sang et sera absorbé majoritairement par le foie. Les chylomicrons résultants de l'hydrolyse, moins grands et moins denses, sont alors captés par les hépatocytes *via* la fixation de l'ApoE au récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL)-cholestérol (LDL-R). Le cholestérol et les TAGs sont alors délivrés aux hépatocytes par internalisation *via* un mécanisme d'endocytose avant d'être transférés dans un endosome précoce afin d'être recyclés (Silbernagl S and Despopoulos A, 2009).

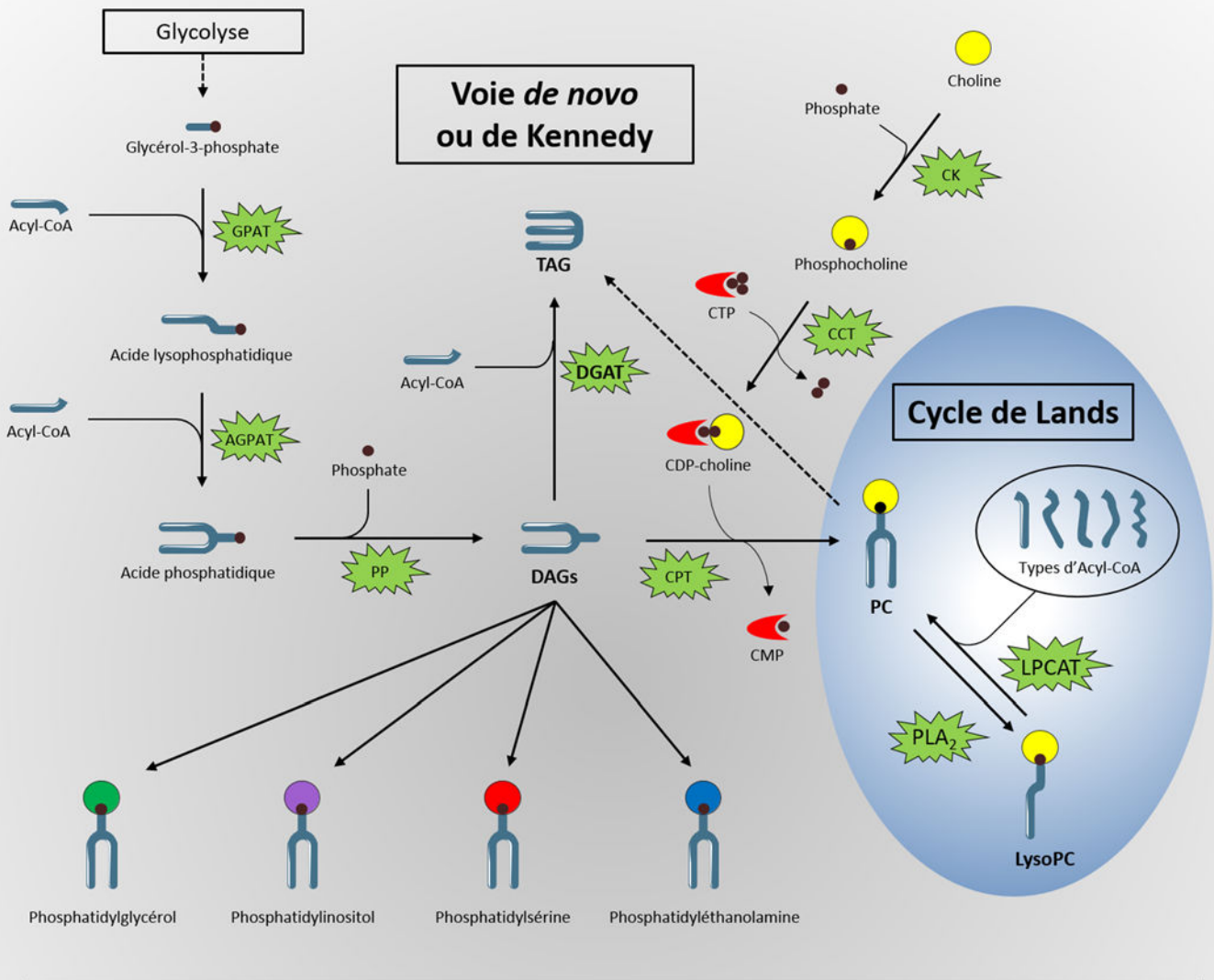
I.1. Triacylglycérols

I.1.A. Lipogenèse

La lipogenèse correspond à la synthèse *de novo* de TAGs à partir de glucose (Pearce J, 1983). Si toutes les cellules peuvent l'effectuer, elle s'opère majoritairement dans le foie ainsi que dans le tissu adipeux, à partir des AG ou du glucose provenant de la digestion du bol alimentaire. En effet, la glycolyse va produire 2 éléments indispensables à la lipogenèse, le glycérol et les acyl-coenzymes A (Acyl-CoA). Ces derniers proviennent des mitochondries par dégradation du pyruvate et contiennent un AG, dont la longueur de la chaîne carbonée est variable. La synthèse des TAGs s'effectue en 4 étapes, les 2 premières étant l'estérification successive de 2 Acyl-CoA sur une molécule de glycérol-3-phosphate par des acyltransférases, afin de former l'acide phosphatidique (AP) (**Figure 1**). La déphosphorylation de l'AP par la phosphatidate phosphatase (PP) permet la génération de diacylglycérol (DAG), puis l'ajout d'un 3^e AG sur le carbone 3 de ce dernier générera un TAG. Cette dernière réaction est catalysée par une diacylglycérol acyltransférase (DGAT). Les TAGs ainsi synthétisés constituent la source majeure d'énergie de l'organisme et sont hydrolysés à façon lors des besoins cellulaires.

I.1.B. Diacylglycérol acyltransférases

Elles font parties de la famille des « membrane bound O-acyltransferases » (MBOAT) et seulement 2 isoformes sont constitutivement exprimées chez les mammifères, DGAT1 et DGAT2. Elles sont fortement exprimées dans les tissus où s'opère essentiellement la lipogenèse (foie, tissu adipeux et intestin) et ne partagent aucune homologie de séquence. Leur localisation subcellulaire est au réticulum endoplasmique (RE), côté luminal pour DGAT1 et cytosolique pour DGAT2, avec toutefois la possibilité pour DGAT2 d'être relocalisée aux gouttelettes lipidiques cytosoliques (GLC) lors d'une stimulation de la synthèse de TAGs (Stone SJ *et al.*, 2009). Elles sont directement impliquées dans la régulation du métabolisme lipidique de par leur fonction de synthèse des TAGs. Leur extinction chez la souris provoque une réduction de la quantité des TAGs, mais également une diminution de l'obésité pour DGAT1, et une hypolipémie létale pour DGAT2 (Smith SJ *et al.*, 2000; Chen HC *et al.*, 2002; Stone SJ *et al.*, 2004).



Enzymes

GPAT : Glycérolphosphate acyltransférase

AGPAT : Acylglycérolphosphate acyltransférase

PP : Phosphatidate phosphatase

CPT : CDP-choline 1,2-diacylglycérol cholinephosphotransférase

DGAT : Diacylglycérol acyltransférase

CPT : CDP-choline:1,2-DAG cholinephosphotransférase

CK : Choline kinase

CMP / CDP / CTP : Cytidine mono / di / triphosphate-phosphocholine

CCT : CTP-cytidylyltransférase

PLA₂ : Phospholipase A₂

LPCAT : Lysophosphatidylcholine acyltransférase

Figure 1 : Voies de synthèse des triacylglycérols et des phospholipides

I.1.C. Régulation de la lipogenèse

La voie de la lipogenèse est réprimée en l'absence de stimulation. En effet, c'est l'augmentation de la glycémie après la digestion du bol alimentaire qui induit la production d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, et entrainera l'activation de la lipogenèse. L'insuline est l'hormone la plus importante dans la stimulation de la lipogenèse et par extension dans la régulation de la glycémie, en favorisant l'incorporation du glucose à partir duquel sera synthétisé des AGs. L'action de l'insuline a pour conséquence l'activation d'Akt (ou protéine kinase B) par phosphorylation, qui à son tour phosphoryle Fox (« Forkhead box protein ») O1 et PGC-1 α (« peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α ») induisant alors leur exclusion nucléaire, leur dégradation, ainsi que l'inhibition de la biogenèse des lipoprotéines de très faible densité (VLDLs) (**Figure 2**). La glycogénèse et la β -oxydation des AGs sont également inhibées, étant respectivement régies par FoxO1 et PGC-1. Akt ne

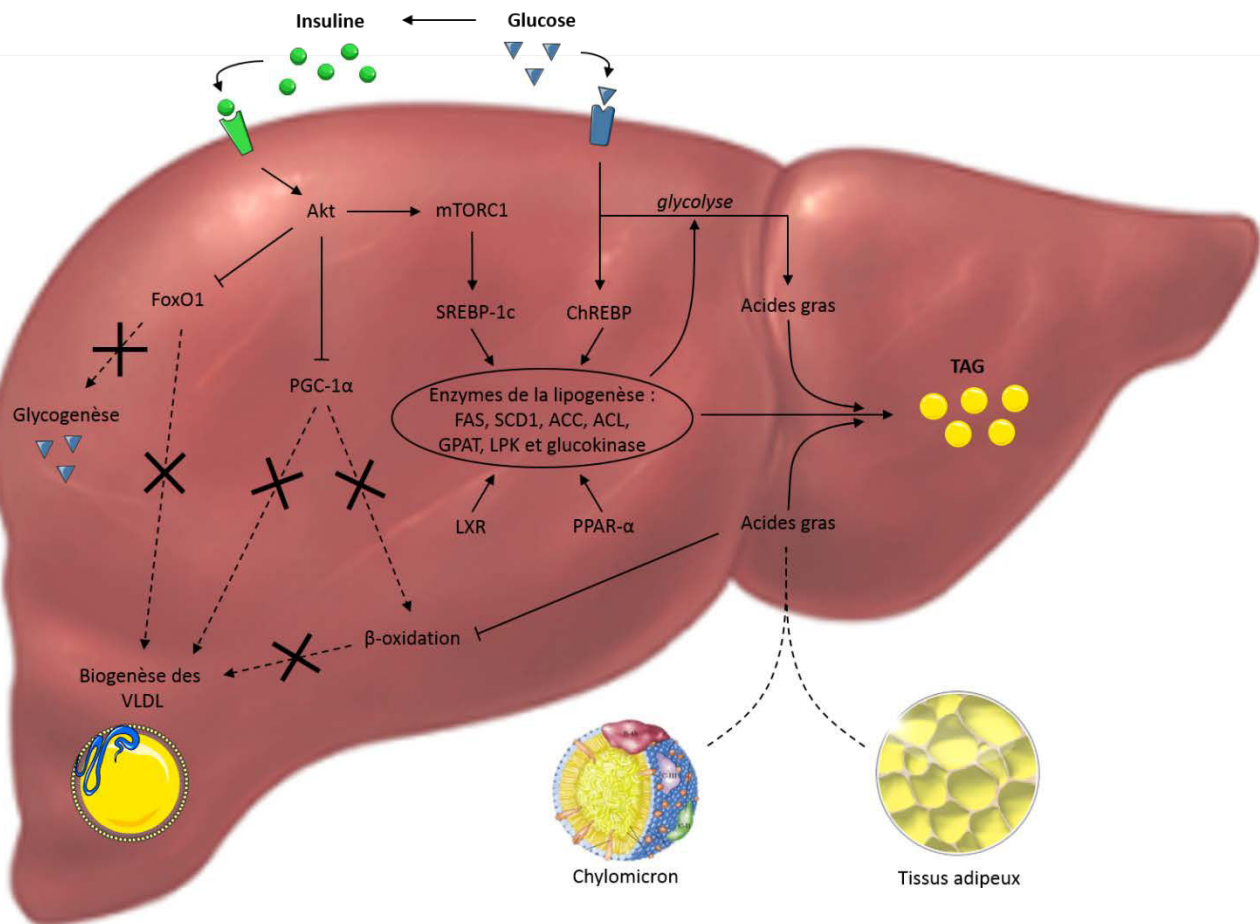


Figure 2 : Régulation de la lipogenèse en condition hyperglycémique d'après (Postic C and Girard J, 2008) & (Leavens KF and Birnbaum MJ, 2011)

possède pas qu'un rôle inhibiteur, il est aussi à l'origine de la stimulation de la lipogenèse en activant mTORC1 (« mammalian target of rapamycin complex-1 ») qui libère le facteur de transcription SREBP-1 (« sterol regulatory element binding protein 1 ») séquestré au RE. La libération de SREBP-1 permet sa maturation dans l'appareil de Golgi, puis sa translocation dans le noyau où elle active les gènes codant les enzymes de la lipogenèse dont les « fatty acid synthase » (FAS), stéaroyl-CoA désaturase-1 (SCD1), acétyl-CoA carboxylase (ACC), adénosine triphosphate citrate lyase (ACL), glycérol phosphate acyltransférase (GPAT), glucokinase et « liver pyruvate kinase » (LPK) (Postic C and Girard J, 2008). L'insuline n'est pas la seule responsable de l'activation de la lipogenèse, le glucose lui-même y contribue l'induction du facteur de transcription ChREBP (« carbohydrate response element-binding protein »). PPAR- α (« peroxysome proliferator activated receptor α ») et le LXR (« liver X receptor ») seraient, dans une moindre mesure, également responsables de l'activation de tout ou partie de ces enzymes (Leavens KF and Birnbaum MJ, 2011). Les AG synthétisés à partir des produits de la glycolyse (voie *de novo*), apportés par les chylomicrons ou encore délivrés par les adipocytes, peuvent être incorporés dans les TAGs à l'aide des enzymes de la lipogenèse. Jusqu'à la normalisation de la glycémie, les hépatocytes favorisent le stockage des TAGs. Une fois la glycémie normalisée, l'inhibition de la sécrétion des VLDLs est levée.

I.2. Synthèse des phospholipides

Les phospholipides (PLs) sont les composants majoritaires des membranes cellulaires, permettant aux organites d'être compartimentés, et donc isolés les uns des autres grâce à leur caractère amphiphile. Ils constituent également les précurseurs de nombreux messagers cellulaires et sont impliqués dans l'inflammation et l'agrégation plaquettaire. Les PLs sont constitués d'une tête hydrophile, comprenant un glycérol-3-phosphate (pour les glycérophospholipides), un groupement phosphate, et un dernier groupement alcool les différenciant, ainsi que de deux chaînes d'AG formant la queue hydrophobe. Leur synthèse s'effectue du côté cytosolique de la membrane du RE, *via* deux voies possibles : la voie *de novo* ou le cycle de Lands (**Figure 1**).

I.2.A. Voie de novo

Aussi appelée voie de Kennedy, elle comprend la synthèse des TAGs et PLs, qui partagent le même précurseur, le DAG. En effet, une fois le groupement phosphate de l'AP hydrolysé par la PP, il peut y avoir formation soit d'un TAG (*cf.* I.1), soit d'un phospholipide. Dans l'exemple de la phosphatidylcholine (PC), une choline est d'abord phosphorylée par la choline kinase, suivi de l'ajout d'une cytidine diphosphate (CDP) catalysé par la cytidine triphosphate-phosphocholine (CTP)-cytidyltransférase (CCT), aboutissant en une cytidine diphospho-choline (CDP-choline) (Kennedy EP and Weiss SB, 1956). La CCT est l'enzyme limitante dans cette voie de synthèse. La dernière réaction, catalysée par la CDP-choline:1,2-DAG cholinephosphotransférase (CPT), permet la synthèse de la PC par l'ajout de la phosphocholine à un DAG.

Les autres phospholipides sont synthétisés selon le même processus, avec une variante pour les phosphatidylglycérols et phosphatidylinositols : au lieu d'être déphosphorylé, l'acide phosphatidique se voit directement transféré une CDP par la CDP-DAG synthétase. Le transfert du groupement inositol ou glycérol se fait ensuite en remplaçant la CDP, de façon identique à la PC (Nanjundan M and Possmayer F, 2003). Toutes ces réactions sont réversibles pour la plupart, permettant une rotation entre les diverses espèces de phospholipides. Ainsi, la phosphatidyléthanolamine peut être recyclée en phosphatidylsérine (et inversement) ou en PC, qui peut elle-même former un TAG *via* l'action de la PC transacylase. Une fois synthétisés au niveau de l'hémimembrane cytosolique du RE, les phospholipides peuvent alors contribuer à la formation des membranes cellulaires, des liposomes ou encore des micelles comme les GLC et les lipoprotéines.

I.2.B. Cycle de Lands

Aussi appelée voie de remodelage, cette voie peut s'effectuer dans d'autres compartiments que le RE comme les mitochondries ou d'autres membranes cellulaires. Le cycle de Lands n'est pas aussi bien connu que la voie de Kennedy, notamment au niveau des enzymes impliquées, mais serait pourtant majoritairement responsable de la diversité des PLs membranaires (MacDonald JI and Sprecher H, 1991). Elle a pour rôle de moduler les PLs au niveau de l'AG en carbone 2, généralement poly-insaturé à l'inverse de

celui en carbone 1 qui est saturé ou mono-insaturé, et repose sur l'action concomitante de deux enzymes. La première enzyme est une phospholipase A qui hydrolyse le glycérol du PL en position sn-2 (PLA₂), libérant la chaîne poly-insaturée et un lysophospholipide (**Figure 1**). Le génome humain code plus d'une trentaine de PLA₂, dont certaines sont exprimées dans les hépatocytes au niveau du RE, du cytosol ou encore à la surface des GLC comme la MAPK/ERK (Murakami M *et al.*, 2011; Menzel N *et al.*, 2012).

La deuxième enzyme est une lysophospholipide acyltransférase (LPLAT), qui transfère un nouvel AG au lysophospholipide par estérification. De fait la diversité des phospholipides au niveau de la longueur et du degré de saturation de leurs AG, les LPLATs sont nombreuses mais peu ont déjà été identifiées (Shindou H *et al.*, 2009).

I.2.C. Lysophosphatidylcholine acyltransférases

I.2.C.a. Classification

La littérature fait état de 13 enzymes appartenant à la famille des LPLATs, qui est organisée en 2 sous-familles, les 1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransférases (AGPATs), et les MBOATs. Ces deux sous-familles se différencient par 8 motifs totalement indépendants les uns des autres et essentiels à leur fonction, 4 étant constitutifs des AGPATs et 4 autres constitutifs des MBOATs (Yamashita A *et al.*, 2007; Shindou H *et al.*, 2013). Les fonctions de ces motifs demeurent cependant inconnues et leur étude nécessiterait une analyse cristallographique des protéines. Les LPCATs font partie des LPLATs et sont au nombre de 5 : LPCAT1, LPCAT2 et la lysophosphatidyléthanolamine acyltransférase 2 (LPEAT2) faisant partie des AGPATs, ainsi que LPCAT3 et LPCAT4 classées dans les MBOATs. Elles permettent l'estérification d'un AG sur une lysophosphatidylcholine en position sn-2 et interviennent donc toutes dans le cycle de Lands (**Figure 1**). Par ce processus, elles participent à établir une diversité et une asymétrie des PLs, et par conséquent contribuent à la maturation et la courbure des membranes (Lands WE, 1958). Leurs fonctions sont d'autant plus importantes que chez les mammifères la PC est le PL majoritairement exprimé dans les membranes, les lipoprotéines et le surfactant pulmonaire (Lands WE and Merkl I, 1963; Zhao Y *et al.*, 2008). De plus, certaines peuvent estérifier un AG sur d'autres lysophospholipides dont la lysophosphatidyléthanolamine (LPCAT3, LPCAT4 et LPEAT2), la

lysophosphatidylsérine (LPCAT3 et LPEAT2) et la lysophosphatidylglycérol (LPCAT1 et LPEAT2). Chez l'Homme, seules LPCAT1 et LPCAT3 sont exprimées dans les hépatocytes, avec potentiellement LPCAT4 qui a été détectée dans la lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain HepG2 (Zhao Y *et al.*, 2008; Matsubara T *et al.*, 2012).

1.2.C.b. Lysophosphatidylcholine acyltransférase 1

LPCAT1 a la particularité par rapport aux autres LPCATs de participer aussi à la voie de Kennedy en catalysant l'ajout d'un AG à l'acide lysophosphatidique pour former un acide phosphatidique. Par conséquent, elle participe à la fois à la diversité des PLs, mais aussi à leur synthèse *de novo*. De plus, sa surexpression augmente la dégradation de la CPT *via* les lysosomes, ce qui tend à réprimer la synthèse de PC par la voie *de novo*, au profit de la voie de remodelage (Butler PL and Mallampalli RK, 2010).

Il a été démontré que lors des réactions LPCAT1 ajoute préférentiellement une palmitoyl-CoA (Chen X *et al.*, 2006). Elle possède également, comme LPCAT2, une activité acyltransférase sur le lyso-FAP qui est le précurseur du facteur d'activation plaquettaire (FAP) (Shindou H and Shimizu T, 2009). LPCAT1 a été décrite comme la plus exprimée et la plus active des LPCATs dans les cellules alvéolaires de type II du poumon, responsables de la synthèse de surfactant qui permet une diminution de la tension de surface des alvéoles (Bridges JP *et al.*, 2010). Ce surfactant est composé à 90 % de lipides, majoritairement de la dipalmitoyl-PC, et LPCAT1 jouerait un rôle prédominant dans sa synthèse (Hishikawa D *et al.*, 2014).

LPCAT1 est également impliquée dans les cancers colorectaux, les lésions cancéreuses gastriques et les carcinomes hépatocellulaires (CHC) où les PLs prédominants sont les PCs et où sa surexpression augmenterait la prolifération et l'évolution du cancer (Mansilla F *et al.*, 2009; Morita Y *et al.*, 2013; Uehara T *et al.*, 2015). Aucun mécanisme n'a cependant été identifié permettant de relier directement les fonctions de LPCAT1 aux mécanismes de prolifération ou de genèse des tumeurs.

Dans les hépatocytes, LPCAT1 est exprimée au RE, mais aussi à la surface des GLC où elle conserve son activité acyltransférase dans le cycle de Lands (Moessinger C *et al.*, 2011). Cette dernière localisation est inattendue car LPCAT1 possède dans sa région carboxy-terminale (C-terminale) un motif KKXX de rétention au RE (Shindou H and Shimizu T,

2009). Ce motif permet l'ancrage de la protéine au RE du côté cytosolique, mais plus son domaine C-terminal est éloigné par rapport à la membrane, plus sa force de rétention devient faible, pouvant expliquer la double localisation de la protéine (Shikano S and Li M, 2003). De plus, il a été décrit que ce motif pouvait également favoriser le transfert de la protéine aux GLCs au lieu de la séquestrer au RE (Ostermeyer AG *et al.*, 2001).

Une étude récente incrimine également LPCAT1 dans le métabolisme des TAGs et le remaniement des GLCs. Son extinction en lignée cellulaire Huh-7 induit une augmentation de la concentration intracellulaire des TAGs, ainsi qu'une diminution de nombre de GLCs mais avec une augmentation de leur taille moyenne, suggérant une fusion des petites GLCs vers des plus grosses (Moessinger C *et al.*, 2014).

I.3. Autres principaux lipides hépatiques

I.3.A. Sphingolipides

Deuxième espèce prédominante des membranaires cellulaires, ils sont les homologues des glycérophospholipides et appartiennent également à la famille des PLs. Ils comprennent à ce titre deux AG, avec un groupement phosphate et un alcool (choline ou éthanolamine), donnant une sphingomyéline. Ils divergent par la structure du glycérol et de l'AG en carbone 1 qui sont organisés en une sphingosine. Les liaisons carbone 1 et 2 à l'oxygène sont remplacées respectivement par une liaison au carbone de l'AG et à un azote. La tête de la phosphorylcholine peut également être remplacée par un (des) ose(s), générant des glycosphingolipides. Les propriétés physicochimiques des sphingolipides restent similaires à celles des glycérophospholipides, avec l'originalité des glycosphingolipides dont la tête glucidique sert de récepteur à certains virus et bactéries (Pollard TD *et al.*, 2004).

I.3.B. Cholestérol

Le cholestérol fait partie des stérols, troisième espèce lipidique la plus importante dans la composition des membranes cellulaires. C'est un élément essentiel dans le métabolisme car il constitue la base de nombreuses hormones stéroïdes comme l'œstrogène, la progestérone ou encore l'hydrocortisone, activatrice des gènes de la glycogénèse dans le foie (rôle antagoniste de l'insuline, donc favorisant la lipolyse). Il participe également à la formation des sels biliaires par son oxydation dans le foie. Le cholestérol provient de

l'alimentation, et est distribué au foie avec les TAGs et AG par les chylomicrons. Il est également synthétisé de façon majoritaire par le foie et les entérocytes à partir de la condensation de 3 AG, formant l'HMG-CoA (hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA) qui subit diverses réactions afin d'aboutir au cholestérol. En cas d'excès, le cholestérol est estérifié afin d'être stocker.

Dans les membranes, le cholestérol permet l'ancrage de nombreuses protéines et participe à la fluidité membranaire en s'opposant à l'empilement des chaînes carbonées, favorisant la diversité membranaire. En effet, une forte concentration en cholestérols et en sphingolipides à un endroit de la membrane permet la génération d'un radeau lipidique, espace plus ordonné et compact favorisant l'ancrage des protéines transmembranaires par exemple.

II. Gouttelettes lipidiques

II.1. Gouttelettes lipidiques cytosoliques

II.1.A. Structure

Toutes les cellules possèdent des GLCs, qu'elles soient constitutives ou transitoires, de taille variable selon le type cellulaire. Elles sont constituées d'un cœur de TAGs et de stérols (esters de cholestérols essentiellement), et entourées d'une monocouche de PLs, principalement la PC (**Figure 3**) (Farese RV, Jr. and Walther TC, 2009). De nombreuses protéines y sont associées, dont des enzymes du métabolisme lipidique, des protéines

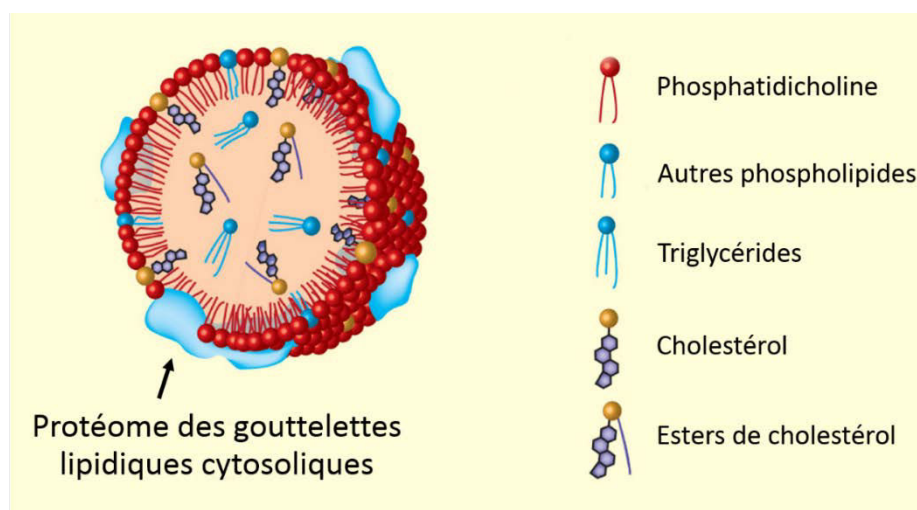


Figure 3 : Composition des gouttelettes lipidiques cytosoliques
d'après (Guo Y *et al.*, 2009)

structurelles ou d'autres protéines impliquées dans le trafic et la signalisation cellulaire. Leur taille initiale est de 0,1 μm , augmentant à mesure de l'incorporation de lipides neutres, et pouvant aller jusqu'à 50 μm (Brasaemle DL and Wolins NE, 2012).

II.1.B. Biogenèse

La morphogénèse des GLC demeure mal comprise, essentiellement au niveau du mécanisme de leur « bourgeonnement » dans le cytoplasme à partir du RE. Elle s'initie par l'action précoce de la « long chain acyl-CoA synthetase 3 » (ACSL3) qui active les AG inertes cytoplasmiques en acyl-CoA, et les met à disposition au niveau de la membrane du RE. A proximité, PLA₂ synthétise des lysophosphatidylcholines dont le potentiel de courbure dans les membranes est plus important, et permet au feuillet cytoplasmique du RE de se déformer, donnant naissance à un globule, précurseur des GLCs (Fuller N and Rand RP, 2001). Les DGATs synthétisent alors les TAGs, à partir des DAGs et des acyl-CoA (*cf.* I.1), qui s'accumulent au sein de la bicouche phospholipidique et promeuvent le « bourgeonnement ». Une partie du protéome des GLCs matures est constituée à cette phase, *via* leur association à la membrane. Le DAG serait responsable du recrutement au lieu de « bourgeonnement » d'une partie de ce protéome et d'enzymes impliquées dans la morphogénèse des GLCs comme la périlipine 3 (aussi appelée TIP47), la CCT ou encore la protéine kinase C (Leikin S *et al.*, 1996; Skinner JR *et al.*, 2009; Krahmer N *et al.*, 2011; Suzuki M *et al.*, 2013). Les LPCATs amplifient ensuite la courbure de la membrane en synthétisant diverses PCs à partir des lysophospholipides générés par la PLA₂, ce qui préviendrait la dégradation des GLCs naissantes ainsi que la fusion avec d'autres GLCs (Pol A *et al.*, 2014). Les globules naissent à la périphérie du RE, et migrent tout au long de leur maturation jusqu'au stade de gouttelette lipidique mature au centre du RE. L'étape de séparation des GLCs est cependant moins bien comprise quant à la topologie des membranes et à l'implication d'un ou deux des feuilletts de la membrane. Trois modèles de « bourgeonnement » ont été émis :

- Le premier constitue le modèle canonique, appelé « bourgeonnement du RE », et ne fait intervenir que le feuillet externe de la membrane du RE. La gouttelette « bourgeonne » vers le cytosol en se refermant à la base afin de clore la GLC (**Figure 4A**, GLC à gauche) (Suzuki M *et al.*, 2011). La gouttelette lipidique peut également rester

ancrée à la membrane du RE, formant un appendice lipidique particulier du RE (**Figure 4A**, GLC à droite) (Guo Y *et al.*, 2009).

- Le modèle bicellaire, quant à lui, forme la GLC par la fusion des deux feuillettes de part et d'autre du cœur de la gouttelette (**Figure 4B**) (Ploegh HL, 2007), laissant un pore dans la membrane du RE qui sera comblé par la jonction ou par la synthèse de phospholipides. Les feuillettes interne et externe du RE comptent donc chacun pour moitié dans la composition de la monocouche des GLCs.

- Le dernier modèle, dit vésiculaire, constitue les GLCs par la formation d'une vésicule possédant une lumière en son sein, comme tout liposome (Walther TC and Farese RV, Jr., 2009) (**Figure 4C**).

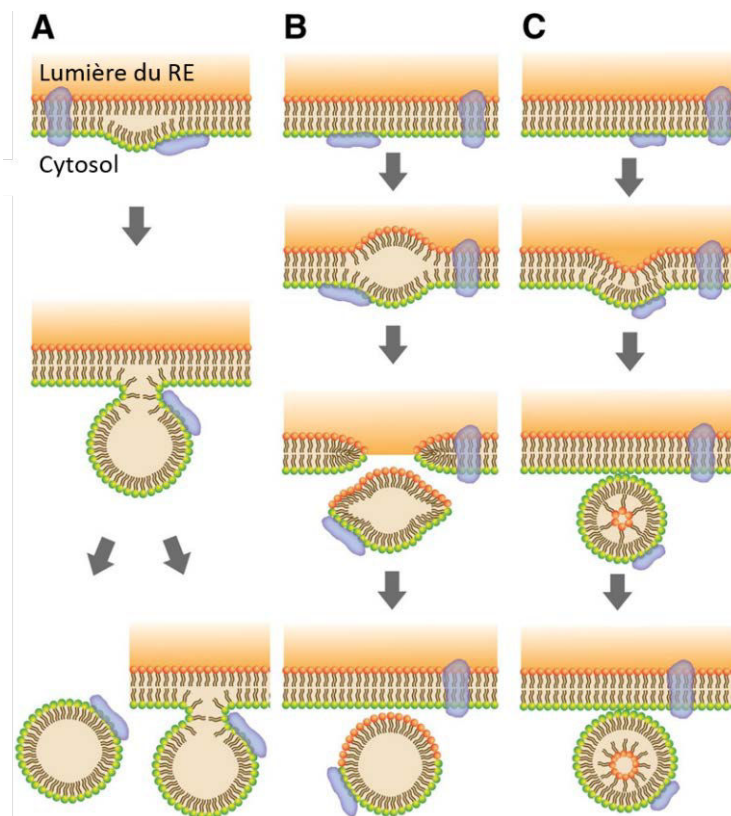


Figure 4 : Modèles de « bourgeonnement » des gouttelettes lipidiques cytosoliques d'après (Kohlwein SD *et al.*, 2013)

Le modèle vésiculaire pourrait expliquer la présence dans le cytoplasme de protéines immatures normalement destinées à être maturées dans le Golgi et permettrait également l'ancrage dans les GLCs de protéines transmembranaires qui nécessitent un double feuillet. Néanmoins le modèle de « bourgeonnement du RE » n'en reste pas moins le plus probable, étayé par des expériences d'électromicroscopie où des GLCs précoces

bourgeonnantes ne sont entourées que par une monocouche de PLs (Kassan A *et al.*, 2013).

Les protéines responsables de la libération des GLCs matures n'ont pas clairement été identifiées, mais une protéine transmembranaire serait fortement impliquée : la seipine. La perte de fonction de cette protéine induit une stagnation des GLCs à la membrane du RE, probablement par une inaptitude à faire converger les TAGs vers les GLCs les plus matures, favorisant la formation de GLCs plus précoces (Cartwright BR and Goodman JM, 2012). Cette hypothèse est confortée par des expériences de surexpression de la seipine qui induit une diminution du nombre de GLCs avec une augmentation de leur taille, indiquant que la seipine intervient dans la fusion des GLCs (Clement S *et al.*, 2013). Ce rôle de guidage des TAGs ne serait pas assuré directement par la seipine, mais par d'autres protéines qu'elle recruterait. Grâce à ses 2 hélices transmembranaires qui lui confèrent un ancrage à la membrane du RE, elle servirait donc de plate-forme de fusion et de largage pour les GLCs.

II.1.C. Protéines associées et leurs fonctions

De nombreuses protéines cellulaires sont associées à la monocouche des GLCs, dont certaines sont parties intégrantes de ces organites (Bartz R *et al.*, 2007). Ce protéome associé aux GLCs est fonction du type cellulaire dans lequel elles sont générées ainsi que des conditions environnementales comme le glucose, les hormones (dont l'insuline) etc... Il comprend des protéines de structure, de jonction, de trafic, ou encore des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique comme DGAT2, la CoA carboxylase, LPCAT1 (Kuerschner L *et al.*, 2008; Stone SJ *et al.*, 2009; Moessinger C *et al.*, 2014). Ces protéines peuvent s'associer aux GLCs soit par liaison avec la tête hydrophile des PLs de la monocouche ou aux lipides à l'intérieur de la GLC, soit par interaction électrostatique avec les autres protéines associées (Welte MA, 2007). Ce protéome est à l'origine des fonctions des GLCs, qui étaient considérées auparavant comme de simples compartiments inertes de stockage.

II.1.C.a. La Famille des périlipines

Anciennement appelées PATs (Périlipine, ADRP, TIP47), les périlipines (PLINs) sont des protéines structurales des GLCs, au nombre de cinq (Kimmel AR *et al.*, 2010). Elles

constituent les protéines les plus importantes dans la stabilisation et la dégradation des GLCs, régulant essentiellement l'accès des lipases aux GLCs (Pawella LM *et al.*, 2014). En effet, PLIN2 et PLIN3, anciennement appelées respectivement ADRP (« adipocyte differentiation-related protein ») et TIP47 (« tail-interacting protein »), sont exprimées de façon ubiquitaire à la surface des GLCs et ont un rôle protecteur pour ces dernières, favorisant le stockage de TAGs. PLIN2 est la protéine la plus exprimée à la surface des GLCs des hépatocytes (Fujimoto Y *et al.*, 2004) (**Figure 5**) et les protège de la lipolyse en les enrobant, empêchant l'action des lipases. Cependant lorsque la synthèse d'AG diminue et qu'un besoin énergétique survient, PLIN2 est dégradée par le protéasome permettant l'accès des lipases aux TAGs (Sahini N and Borlak J, 2014). PLIN3 est également impliquée dans la biogenèse des GLCs en favorisant l'enrichissement des globules en TAGs, potentiellement par le recrutement d'autres partenaires (Ohsaki Y *et al.*, 2006; Bulankina AV *et al.*, 2009). Si le mécanisme mis en jeu pour l'enrichissement est hypothétique, c'est l'affinité de PLIN3 pour les DAGs qui lui permet d'être localisée aux globules à un stade précoce de la biogenèse des GLCs (Skinner JR *et al.*, 2009).

PLIN5 (OXPAT ou PAT1) a un rôle antagoniste et n'est activée par phosphorylation, catalysée par la protéine kinase A (PKA), qu'en réponse à un besoin énergétique. PLIN5 recrute alors l'adipose triglycérade lipase, qui se fixe à CGI-58 à la surface des GLCs afin d'hydrolyser les TAGs (Suzuki M *et al.*, 2011). L'activation de PLIN5 permet également le recrutement des GLCs aux mitochondries afin de les dégrader, libérant des AGs par β -oxydation (*cf.* III.1) (Wang H *et al.*, 2011).

Physiologiquement, PLIN1 (pérlipine) et PLIN4 (S3-12) ne sont pas constitutivement exprimées dans les hépatocytes humains. Leur expression n'a été détectée que lors de la stéatose et serait régie par l'expression prolongée des PPARs (Bickel PE *et al.*, 2009; Okumura T, 2011). L'action de PLIN1 est similaire à celle de PLIN5. Avant d'être phosphorylée pour exercer sa fonction, elle recrute la lipase sensible aux hormones (HSL) qui hydrolyse les TAGs (Sztalryd C *et al.*, 2003). Le rôle de PLIN4 est peu décrit mais semble être similaire à celui de PLIN3, théorie renforcée par l'homologie de séquence qu'elles partagent (Wolins NE *et al.*, 2006).

Le destin des GLCs est donc régi en partie par la balance entre les périlipines, PLIN2 et PLIN3 permettant leur protection lors de la lipogenèse, PLIN5 permettant leur dégradation lorsqu'un besoin énergétique survient (PLIN1 également en cas de stéatose). Les PLINs sont elles-mêmes régulées positivement par l'action des PPARs, à l'exception de PLIN3 qui, elle, subit une répression, les impliquant donc toutes dans la lipogenèse (Okumura T, 2011). En contexte physiologique, PLIN3 s'accumule aux GLCs les plus petites, tandis que PLIN5 s'associe préférentiellement avec celles de taille plus élevée (**Figure 5**), suggérant une élimination des plus grosses GLCs afin de prévenir une accumulation pathologique des lipides (Sahini N and Borlak J, 2014). Il a été observé que l'expression de PLIN2, préservant également les GLCs de la lipolyse, corrèle positivement avec l'évolution de la stéatose et y jouerait un rôle important de par sa fonction (Pawella LM *et al.*, 2014). Etant constitutivement activée et augmentant donc graduellement lors de la stéatose, elle représente un marqueur pertinent dans le diagnostic de cette pathologie (Heid HW *et al.*, 1998; Straub BK *et al.*, 2013).

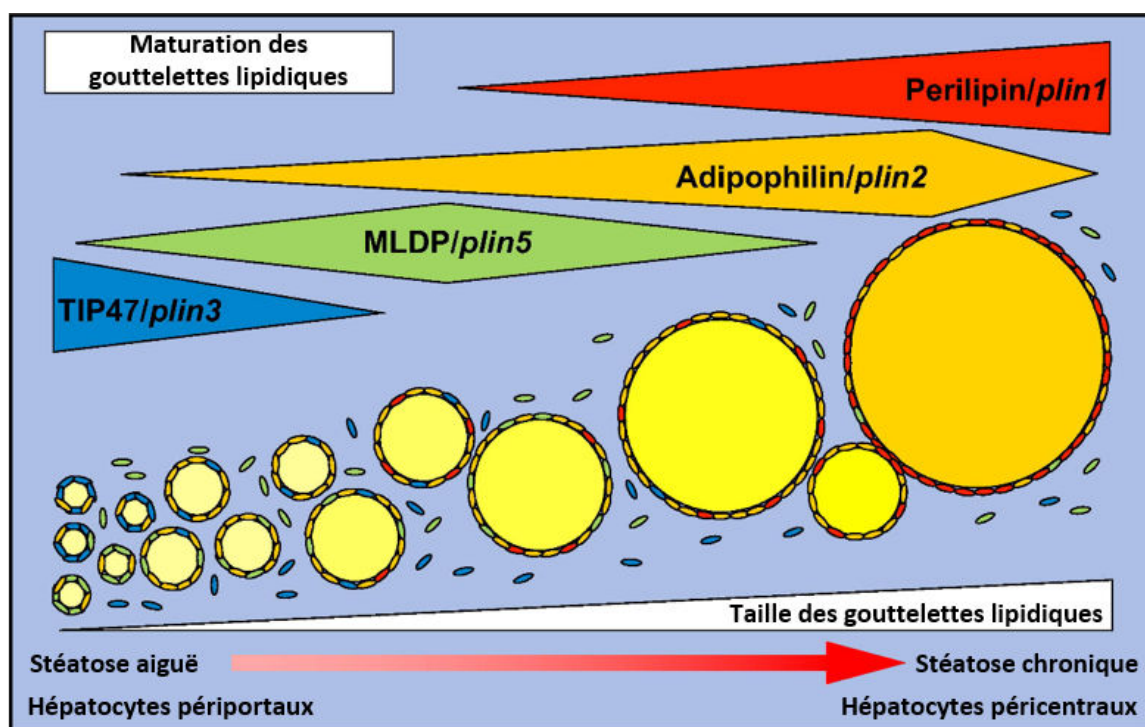


Figure 5 : Répartitions des périlipines à la surface des gouttelettes lipidiques cytosoliques en fonction de leur taille ou de l'avancement de la stéatose
d'après (Pawella LM *et al.*, 2014)

II.1.C.b. Les Rabs

La seconde famille de protéines la plus exprimée à la surface des GLCs est celle des petites GTPases, les Rabs (« Ras superfamily of GTPases »). Ces protéines ne sont pas exclusivement exprimées aux GLCs. Elles sont présentes de façon générale à la surface des vésicules comme les endosomes et contribuent à leur trafic cellulaire. Tout comme les PLINs, elles participent au devenir des GLCs, mais en régulant leur localisation cellulaire au niveau du RE, du Golgi, dans le cytosol... Rab18 est la première à intervenir dans la biogenèse des GLCs en inhibant l'association de PLIN2 par sa propre fixation aux GLCs. Cela a pour conséquence de rapprocher et séquestrer les GLCs en cours de formation à la membrane du RE, permettant leur maturation et enrichissement en TAGs (Ozeki S *et al.*, 2005). Pour les GLCs déjà formées, Rab18 favorise leur retour au RE où elles pourront participer à l'enrichissement d'autres gouttelettes (*cf.* II.2). Néanmoins, l'expression de Rab18 est stimulée, comme pour PLIN2, par la lipogenèse induite par l'insuline, suggérant qu'un équilibre entre ces 2 facteurs est nécessaire. De plus, l'action de Rab18 est auxiliaire car, lors de sa surexpression en lignée cellulaire HepG2, le volume total des GLCs n'augmente pas, indiquant que les GLCs une fois matures sont libérées et non surenrichies en lipides par un ancrage prolongé au RE.

Rab18 n'est cependant pas la seule GTPase importante dans le destin des GLCs. En tant qu'organe de stockage des lipides, les GLCs peuvent s'enrichir en lipides après leur genèse, notamment en captant les lipides de la circulation sanguine, *via* l'entrée de ces derniers par l'intermédiaire des endosomes. Ce sont les Rab5, 7 et 11 qui régulent ce trafic des endosomes et leurs interactions, dont celles avec les GLCs. Alors que Rab5 est constitutif des endosomes précoces et Rab7 des endosomes tardifs, Rab11 est quant à elle exprimée de façon indépendante au niveau des deux types d'endosomes, mais intervient plus spécifiquement dans le transport du cholestérol (Holtta-Vuori M *et al.*, 2002; van der Blik AM, 2005). Les TAGs et le cholestérol entrent dans la cellule par endocytose, *via* le LDL-R s'ils sont transportés par une lipoprotéine, et sont acheminés en partie aux GLCs par l'interaction de ces protéines Rab entre elles.

Rab5 et 11 sont également impliquées dans la préservation des GLCs en empêchant leur catabolisme (Liu P *et al.*, 2007; Goodman JM, 2008), tandis que Rab7 au contraire est nécessaire à leur dégradation (Schroeder B *et al.*, 2015).

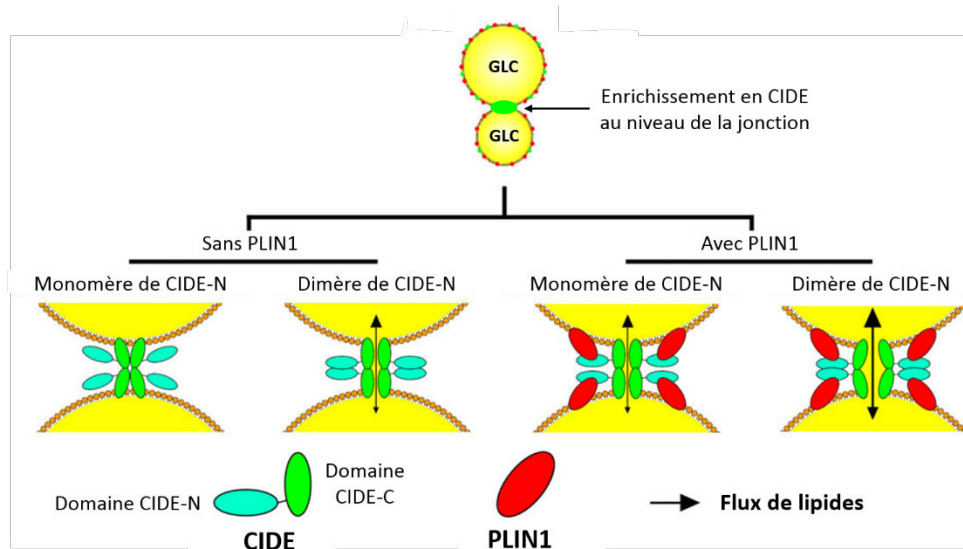
II.1.D. Devenir des gouttelettes lipidiques cytosoliques

Les GLCs ont longtemps été considérées comme de simples compartiments inertes de stockage, mais leur étude ainsi que celle de leur protéome a révélé qu'elles sont en fait très dynamiques et impliquées dans de nombreuses fonctions qui dépendent du protéome qui leur est associé (Guo Y *et al.*, 2009; Murphy S *et al.*, 2009). Elles sont désormais considérées comme des organites à part entière des cellules, même si leur fonction première reste la régulation et le stockage des lipides neutres et l'isolement des AG libres qui sont toxiques dans le cytoplasme. Lors de leur genèse, certaines GLCs restent ancrées au RE (**Figure 4**), ou y reviennent par la suite, et constituent une plate-forme d'échange entre le RE et les GLCs matures. Ces GLCs résidentes du RE sont caractérisées par la présence de GPAT4 qui transite du RE jusqu'à la membrane des GLCs (Wilfling F *et al.*, 2013). Les GLCs sont également impliquées dans la biogenèse des VLDLs, y compris les GLCs demeurant aux RE (*cf.* III.1).

II.1.D.a. Fusion des gouttelettes lipidiques cytosoliques

Nous avons vu que les GLCs matures peuvent s'enrichir en lipides provenant de la circulation sanguine. Une autre possibilité de contribuer à leur enrichissement en TAGs est la fusion des GLCs entre elles par deux mécanismes possibles, impliquant soit les protéines « Cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like effector » (CIDEs), soit les « Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptors » (SNAREs) (**Figure 6**) :

- Les CIDEs sont au nombre de 3 chez l'Homme (A, B et C) et sont composées de 2 domaines, un domaine N-terminal (CIDE-N) et un domaine C-terminal (CIDE-C) qui permet leur ancrage dans les gouttelettes (Yonezawa T *et al.*, 2011). C'est également ce dernier domaine qui est responsable de la fusion des GLCs par l'association en dimère des CIDEs de chaque GLC formant alors un pont. Les domaines N-terminaux permettent de renforcer la jonction des 2 domaines C-terminaux, en s'associant également entre eux et/ou en s'associant sur leur propre GLC avec PLIN1 (Sun Z *et al.*, 2013). Les 2 GLCs fusionnent alors par fusion des membranes, le contenu de la plus petite allant toujours dans la plus grande. Ceci est dû à l'écart de pression interne des GLCs (Xu L *et al.*, 2012).



Fusion par les CIDEs

Fusion par les SNAREs

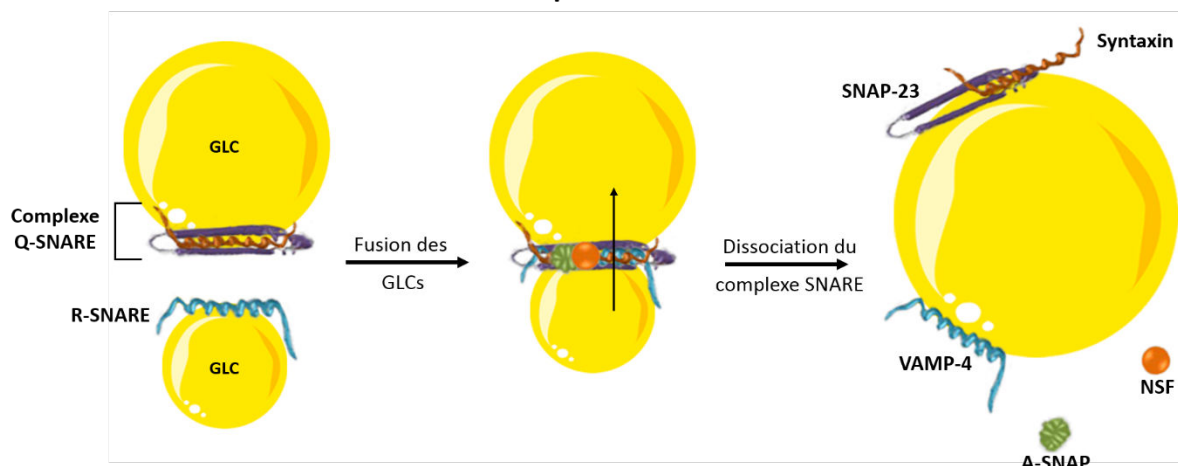


Figure 6 : Mécanismes de fusion des gouttelettes lipidiques cytosoliques
d'après (Sun Z *et al.*, 2013; Sahini N and Borlak J, 2014)

- Le complexe SNARE agit sur le même principe que les CIDEs, mais avec d'autres récepteurs membranaires dont la syntaxin-5, VAMP4 (« vesicle-associated membrane protein 4 ») et SNAP23 (« synaptosomal-associated protein of 23 kDa »). Brièvement, les deux GLCs fusionnent par l'interaction de 2 complexes SNAREs : un complexe R-SNARE (VAMP4) situé sur la plus petite des GLCs et un complexe Q-SNARE (SNAP-23 et syntaxin-5) sur la plus grosse s'entrelacent pour former une structure à 4 hélices. Les 2 GLCs fusionnent ainsi par la jonction de leur membrane (Bostrom P *et al.*, 2007). Les auteurs de cette étude supposent néanmoins que la fusion des GLCs reste un événement rare, concernant environ 15 % des gouttelettes, et que leur expansion se fait essentiellement par un enrichissement en TAGs. La fusion d'une GLC avec une autre gouttelette au RE est

également possible *via* ces mécanismes de fusion, indiquant que les GLCs peuvent également contribuer à la formation et/ou maturation des VLDLs (Yonezawa T *et al.*, 2011). En parallèle à ces 2 mécanismes, il a été démontré *in vivo* et *in vitro*, que l'AP promeut la fusion des GLCs (Fei W *et al.*, 2011).

II.1.D.b. Catabolisme des gouttelettes lipidiques cytosoliques

Le dernier destin des GLCs est d'être catabolisé lors d'un besoin énergétique de l'organisme relayé par des messagers hormonaux et/ou des signaux inflammatoires afin d'induire la lipolyse. Les GLCs peuvent être dégradées de 2 façons, aboutissant dans tous les cas à la libération d'un glycérol et de 3 AGs qui seront dégradés lors de la β -oxydation dans les mitochondries :

La première voie catabolise les GLCs en hydrolysant directement les TAGs à l'intérieur de la gouttelette, action effectuée potentiellement par de nombreuses enzymes hépatiques. Cependant, l'adipose triglyceride lipase (ATGL) est l'enzyme participant de façon majoritaire à cette hydrolyse dans les hépatocytes (Ong KT *et al.*, 2011) et est régulée par son association avec d'autres protéines comme CIDEA, PLIN2 et 5 (Mashek DG *et al.*, 2015). Les AGs résultants sont en partie acheminés aux mitochondries où leur recyclage participe à la synthèse des VLDL (*cf.* III.1). Un phénomène amplificateur de cette voie serait la phosphorylation de la sérine 492 de PLIN1 par la PKA qui induit une fission des GLCs. Le rapport surface/volume des GLCs est donc augmenté, ce qui accroît l'accessibilité des lipases à la membrane (Marcinkiewicz A *et al.*, 2006). La seconde voie, dite lipophagique, fait intervenir Rab7 à la surface des GLCs qui permet à des phagosomes d'internaliser les GLCs et de procéder à leur dégradation par des lipases phagosomales (Singh R *et al.*, 2009). Les AGs résultants sont transférés dans les mitochondries de la même façon que pour la première voie. Une fonction hypothétique des GLCs serait la séquestration de protéines cytotoxiques ou mal conformées, prévenant ainsi des interactions nocives pour la cellule jusqu'à leur dégradation ou celle de la GLC (Welte MA, 2007).

En conclusion, nous avons vu que les GLCs ne sont pas seulement des organites de stockage mais ont de nombreuses fonctions qui sont dépendantes de leur protéome associé, qui dicte leur destinée.

II.2. Gouttelettes lipidiques lumineales

Certaines études de microscopie électronique suggèrent l'existence de gouttelettes lipidiques lumineales (GLLs) (Alexander CA *et al.*, 1976; Hamilton RL *et al.*, 1998), qui a été confirmée biochimiquement. Elles sont pourtant indispensables à la maturation des VLDLs (*cf.* III.2). Appelées parfois « micrososome-associated luminal lipid droplets » (MALD), elles sont définies comme des vésicules résultant de la fragmentation du RE et non associées à l'ApoB (Yao Z *et al.*, 2013).

Les GLLs sont les homologues des GLCs, formées à partir de l'accumulation de TAGs dans la membrane du RE, mais « bourgeonnent » vers la face lumineale du RE (**Figure 7**). Chez la souris, leurs structures sont identiques, avec cependant une quantité plus élevée de cholestérol libre et de PLs dans la GLL que dans la GLC (Wang H *et al.*, 2007). Appartenant à 2 compartiments cellulaires différents, leur protéome l'est aussi.

Contrairement au protéome des GLCs, celui des GLLs a été peu étudié, souffrant du manque de techniques permettant leur purification sans contamination par les GLCs ou les pré-VLDLs. De nouveaux protocoles permettant de surmonter ces obstacles viennent d'être développés, rendant possible une étude approfondie de leur protéome et donc de leur biogenèse (Wang H *et al.*, 2013). Les GLLs ne possèdent pas de protéine d'enrobage telles que les PLINs ou les Rabs, indiquant que les GLCs ne pourraient pas participer directement à la formation des GLLs. Elles partagent néanmoins certaines protéines, dont, étonnamment, la « Binding immunoglobulin Protein » (BiP) qui est une chaperonne normalement exclusivement présente dans le RE. Les GLLs possèdent également à leur surface la TAG hydrolase (TGH), et les ApoC et E (Wang H *et al.*, 2007). De façon intéressante, l'ApoE est retrouvée sur les GLLs de plus grande taille, tandis que la TGH est présente sur les plus petites gouttelettes.

A défaut de participer directement à la formation des GLLs, les GLCs peuvent y contribuer indirectement par un transfert des TAGs à la membrane du RE, gouverné par la « microsomal triglyceride transfer protein » (MTP) (Lehner R *et al.*, 2012).

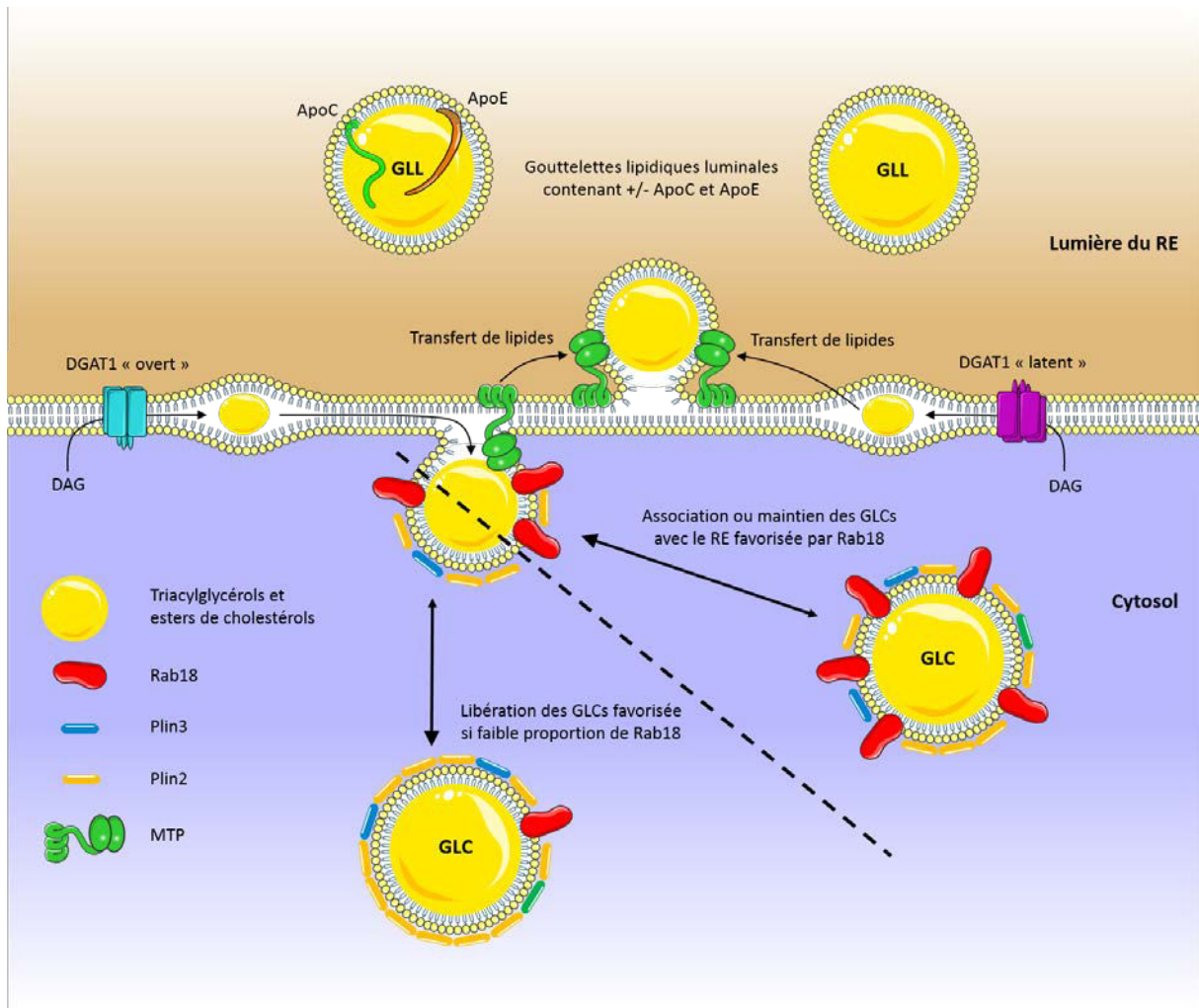


Figure 7 : Biogenèse des gouttelettes lipidiques lumineales

L'augmentation de l'accessibilité à la surface des GLCs induite par l'inhibition de PLIN2 conduit d'ailleurs à l'augmentation de la sécrétion des VLDLs dans les cellules hépatocytaires de rat (Magnusson B *et al.*, 2006). Des protéines comme CIDEB et Rab18 se fixeraient davantage aux GLCs, favorisant leur retour au RE afin de mettre à disposition leur contenu en TAGs pour la biogenèse des GLLs ou des VLDLs.

La MTP joue un rôle fondamental dans la genèse (*cf.* III.1) comme le démontre les expériences d'inhibition de son expression qui induit une diminution de l'accumulation de TAGs au sein des MALDs (Kulinski A *et al.*, 2002). De plus, l'invalidation du gène codant la MTP abolit la formation de MALDs (Raabe M *et al.*, 1999). L'une des isoformes de DGAT1 serait également responsable de la partition des TAGs vers les GLLs. En effet, DGAT1 existe sous 2 formes : l'une dite « latente », serait responsable du transfert des TAGs de la

membrane du RE vers les GLLs, tandis que l'autre, dite « ouverte » les transférerait vers les GLCs (Wurie HR *et al.*, 2011).

III. La biogenèse des VLDLs

Principales vésicules de sécrétion des TAGs, les VLDLs sont synthétisées exclusivement par les hépatocytes. Les VLDLs partagent la même structure de base que les GLCs et les GLLs, et se distinguent également de ces dernières par leur protéome. Elles contiennent une molécule unique d'ApoB-100 à leur surface (**Figure 8**), seule Apo dite « non-

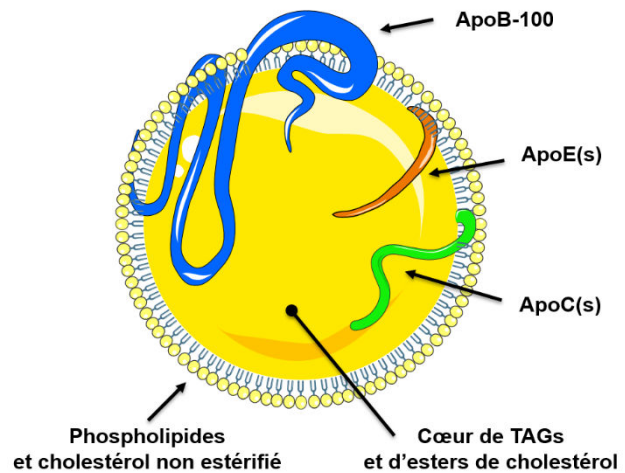


Figure 8 : Composition des VLDLs

échangeable » car ne peut pas être désappareillée des VLDLs ni dans la cellule, ni dans la circulation sanguine, contrairement aux Apos « échangeables ». L'ApoB-100 est uniquement synthétisée par les hépatocytes et dans une moindre mesure les entérocytes. Les VLDLs possèdent également d'autres molécules d'Apo échangeables, ApoE et/ou ApoC, qui s'associeraient aux VLDLs pendant et/ou après leur maturation/sécrétion. Leur contenu en lipides confèrent aux VLDLs une densité extrêmement faible, entre 0,930 et 1,006 g/ml, les caractérisant. Les apolipoprotéines ont 4 grandes fonctions pour la lipoprotéine : elles favorisent sa formation, participent à sa structure, servent de ligands pour les récepteurs cellulaires, et régulent l'activité de certaines enzymes du métabolisme lipidique (lécithine cholestérol acyltransférase, LPL, lipase hépatique) (Feingold KR and Grunfeld C, 2000). L'ApoB-100, contrairement à l'ApoB-48, est dotée du domaine de fixation au LDL-R, permettant aux VLDLs d'être endocytosées. La biogenèse des VLDLs n'est pas encore totalement élucidée, certaines étapes et acteurs demeurant inconnus, mais peut être décrite en 4 étapes clefs.

III.1. Lipidation de la pré-VLDL

La formation des VLDLs débute lors de la traduction de l'ApoB par les ribosomes à la membrane du RE rugueux, côté cytosolique. L'ApoB en cours de synthèse est progressivement transloquée dans le RE, où elle s'associe simultanément avec des TAGs sous l'action de la MTP, formant ainsi une pré-VLDL partiellement lipidée (**Figure 9**).

Les TAGs participant à cette lipodation de l'ApoB proviennent primitivement de la synthèse *de novo* (cf. I.1.A), au cours de laquelle la forme latente de DGAT1 les synthétiserait et favoriserait leur transfert dans le RE (Wurie HR *et al.*, 2011). Ceci concorde avec les études en hépatocytes de souris et de rats, où la surexpression de DGAT1 aboutit à une augmentation de sécrétion des VLDLs (Liang JJ *et al.*, 2004; Yamazaki T *et al.*, 2005). Dans certaines circonstances entraînant une lipodation anormale de l'ApoB, il a été observé une stase des GLCs en cours de synthèse à la membrane du RE. Il en résulte une accumulation de lipides dans la bicouche et d'ApoB à sa surface formant alors une structure appelée « ApoB-crescent » (Ohsaki Y *et al.*, 2008). Cependant cette accumulation demeure anormale et conduirait les ApoBs lipidées de la sorte à leur dégradation par le protéasome.

Les TAGs stockés dans les GLCs peuvent également participer à la lipodation de l'ApoB : Rab18 à la surface des GLCs recrute les TAGs à la membrane du RE, mais aussi les enzymes du métabolisme lipidique permettant cet échange (Martin S *et al.*, 2005; Ozeki S *et al.*, 2005) (**Figure 7**). CIDEB y contribuerait fortement de par sa capacité à interagir avec ApoB. Ancrée à la surface des globules et des GLCs (cf. II.1.D.a), CIDEB est recrutée par l'ApoB en cours de synthèse et permet, au cours de sa translocation dans le RE, de guider les TAGs et PLs vers la pré-VLDL (**Figure 9**) (Ye J *et al.*, 2009). De plus, CIDEB participe à l'enrichissement lipidique des GLCs et est l'un des chaînons manquants dans l'inaptitude de la lignée cellulaire Huh-7 à sécréter d'authentiques VLDLs (cf. Chapitre 2 : II.3).

Les AGs constituent la dernière possibilité de contribuer à la lipodation de l'ApoB, qu'ils proviennent directement de l'alimentation ou bien de la dégradation de lipides intracellulaires. Ils sont captés par les mitochondries où ils servent de substrats à la β -oxydation, générant ainsi de l'acétyl-CoA qui sert à son tour de substrat pour la synthèse de TAGs à la membrane du RE.

La MTP est responsable du transfert de ces TAGs et des PLs sur l'ApoB en cours de synthèse, et est constituée de 3 domaines : un domaine d'ancrage à la membrane du RE, un domaine de fixation à l'ApoB et un 3^e domaine permettant le transfert des lipides (TAGs comme PLs) (Hussain MM *et al.*, 1998; Liang J and Ginsberg HN, 2001; Hussain MM *et al.*, 2003). Récemment, le groupe d'Hussain a démontré *in vivo* que seule l'activité de transfert des PLs du 3^e domaine était nécessaire pour la sécrétion de VLDLs matures

(Khatun I *et al.*, 2012), avec cependant un enrichissement inférieur en TAGs et donc une densité plus élevée.

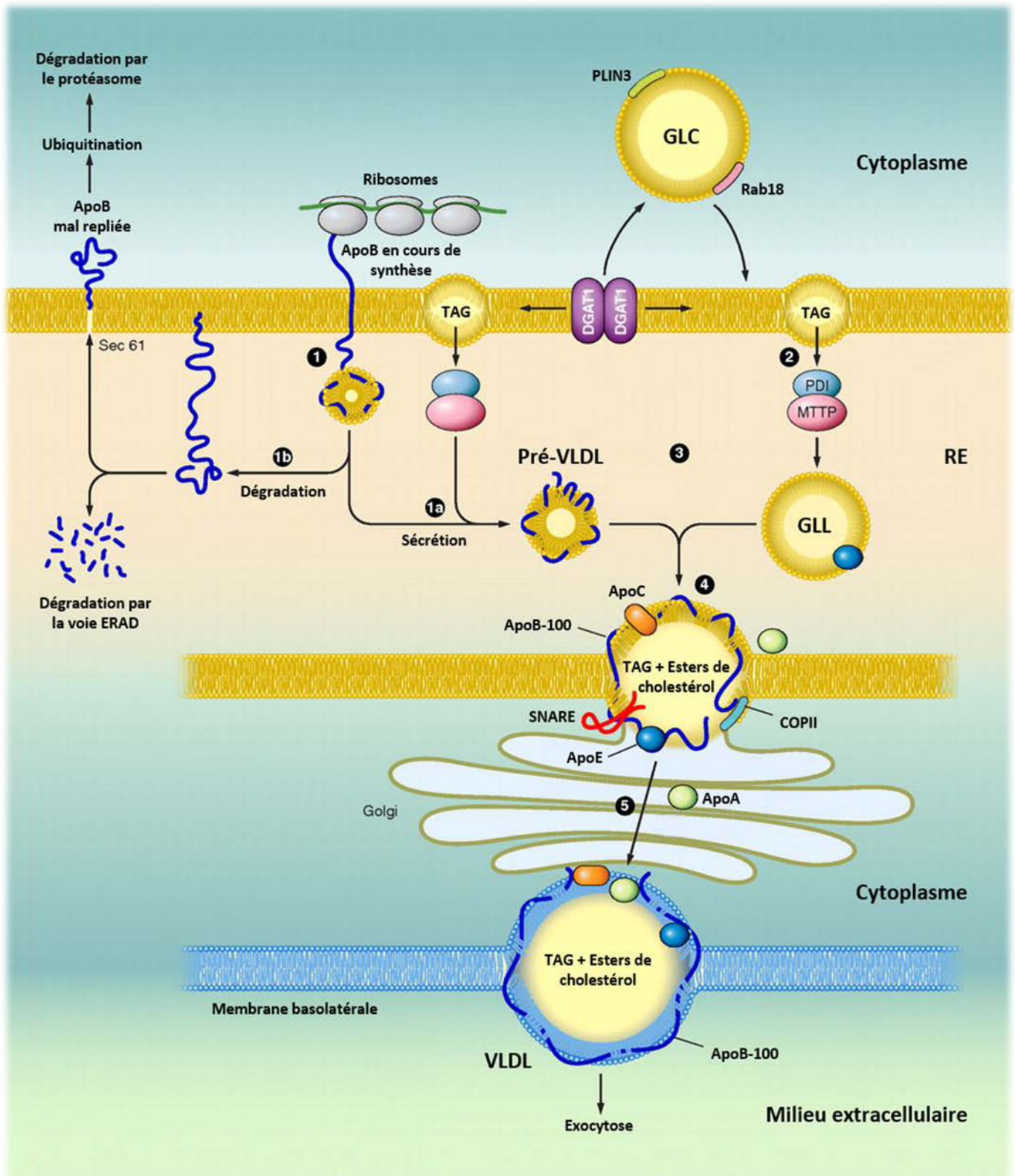


Figure 9 : Biogenèse des VLDLs
d'après (Abumrad NA and Davidson NO, 2012)

III.2. Destin de la pré-VLDL

Lorsque la disponibilité en TAGs est limitée ou si l'activité de la MTP est altérée, l'ApoB non lipidée est rapidement dégradée soit par la voie de dégradation associée au RE (ERAD), soit par rétro-translocation dans le cytosol, ubiquitinylation puis dégradation par le protéasome (Fisher EA *et al.*, 2001; Fisher EA, 2012). Il est à noter qu'une mutation inactivant la MTP induit une hypobétalipoprotéinémie, par l'altération de la formation des VLDLs (Di Leo E *et al.*, 2005). Si l'ApoB n'est pas dégradée, la pré-VLDL poursuit sa maturation par un enrichissement en lipides. Dans une **première hypothèse**, cette tâche incomberait à la GLL soit par fusion avec la pré-VLDL, procurant de fait à cette dernière l'ApoE et/ou l'ApoC, soit en fournissant à la MTP les substrats nécessaires afin de lipider la pré-VLDL (**Figure 9**, étape 3) (Mitchell DM *et al.*, 1998; Rustaeus S *et al.*, 1998). Le rôle de l'ApoE dans la morphogenèse des VLDLs n'est pas élucidé, mais la littérature s'accorde sur le fait qu'elle la favorise (Kuipers F *et al.*, 1997; Maugeais C *et al.*, 2000), sans toutefois être indispensable (Gusarova V *et al.*, 2007). Etant une Apo échangeable, elle peut également s'associer au VLDLs en dehors du RE, notamment dans le Golgi ou même dans la circulation sanguine (*cf.* I).

La pré-VLDL sera ensuite acheminée dans une vésicule de transport des VLDLs (VTV) au Golgi, où elle rentre par fusion impliquant le complexe SNARE et le facteur 1 d'ADP-ribosylation (ARF1) (Tiwari S and Siddiqi SA, 2012). La **seconde hypothèse** concernant la maturation des VLDLs situe l'enrichissement en lipides pendant cette étape, où la VLDL en cours de transfert fusionnerait directement avec une GLC (**Figure 10**). Singaravelu et collaborateurs avancent l'hypothèse d'un recrutement des GLCs *via* l'interaction entre l'ApoB et CIDEB précédemment décrite (Singaravelu R *et al.*, 2013). Cependant, il n'est pas expliqué comment CIDEB interagit avec ApoB, qui est située à l'intérieur de la VTV. La fusion au préalable de la GLC et de la VTV serait nécessaire, soit par le mécanisme des SNAREs, soit par celui des CIDEs elles-mêmes.

III.3. Maturation au Golgi

Une fois dans le Golgi, les pré-VLDLs subissent des modifications indispensables afin d'aboutir aux VLDLs matures, comme leur phosphorylation ou encore la glycosylation de l'ApoB. C'est également dans le Golgi que se déroulerait l'enrichissement en lipides, selon la **troisième hypothèse**, par l'action conjointe d'ERK2 (« extracellular signal-regulated

kinase 2 ») et de la phospholipase D1, activée par ARF1 (Gibbons GF *et al.*, 2004). Ces deux enzymes interviennent dans la formation des GLCs stimulée par l'insuline, en promouvant respectivement la synthèse de TAGs et l'enrobage des GLCs par PLIN3 (Marchesan D *et al.*, 2003; Andersson L *et al.*, 2006). La formation des GLCs ainsi favorisée permet d'augmenter la disponibilité en TAGs au sein du Golgi (Olofsson SO *et al.*, 2007), et par conséquent d'enrichir les VLDLs en lipides (Kulinski A *et al.*, 2002; Gusarova V *et al.*, 2007; Li X *et al.*, 2012). L'analyse du protéome des VTVs indique l'absence d'ApoAI dans ces vésicules (Rahim A *et al.*, 2012), tandis que les VLDLs sortant du Golgi sont associées à cette Apo (Tiwari S and Siddiqi SA, 2012). Cette observation soulève une hypothèse alternative qui impliquerait le transport d'ApoAI du RE au Golgi par une autre vésicule, pouvant également contenir une GLL afin de lipider les VLDLs. Si la VLDL n'est pas suffisamment lipidée ou mal conformée, elle sera éliminée par le mécanisme de protéolyse pré-sécrétoire post-RE (PERPP) faisant intervenir l'autophagie (Pan M *et al.*, 2008). Si les VLDLs sont parfaitement matures, elles intègrent de nouveau une VTV afin d'être sécrétées par exocytose.

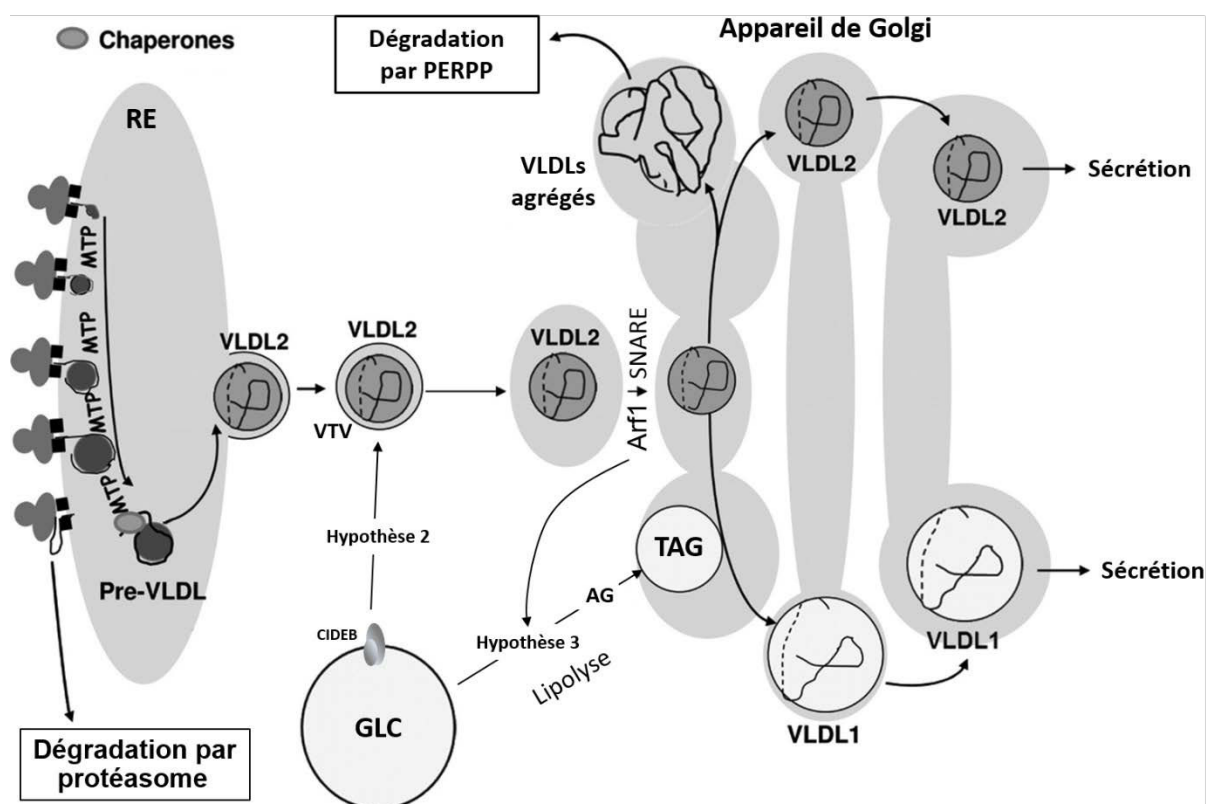


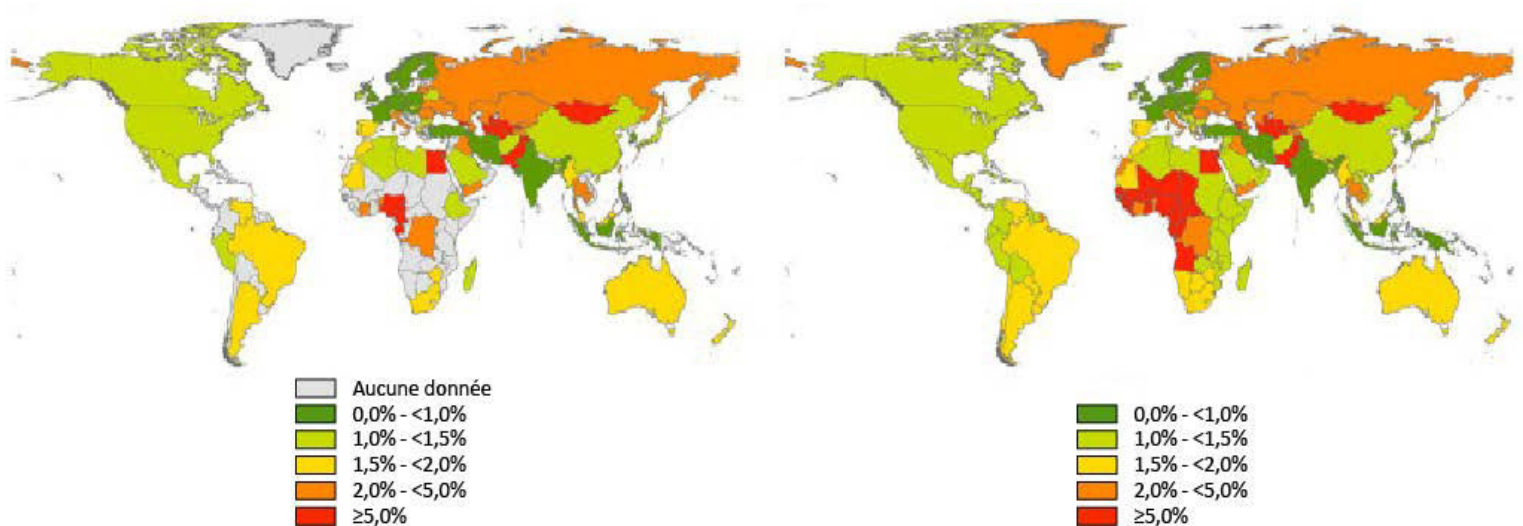
Figure 10 : Maturation et sécrétion des VLDLs
d'après (Olofsson SO and Boren J, 2012)

Chapitre 2 : Le virus de l'hépatite C

I. L'hépatite C

I.1. Epidémiologie

L'hépatite C est une maladie virale constituant un problème majeur de santé publique, touchant 130 à 150 millions de personnes dans le monde selon l'organisation mondiale de la santé, soit environ 1,7 à 2 % de la population mondiale. Ces chiffres sont probablement sous-estimés dû au manque de données dans certains pays, dont ceux d'Afrique centrale et de l'ouest essentiellement (**Figure 11A**), où la prévalence y est estimée très élevée (**Figure 11B**). De plus, le caractère souvent asymptomatique de l'infection par le VHC amplifie cette sous-évaluation, y compris dans les pays développés. A l'inverse, la plupart des études surévalueraient la prévalence en se focalisant uniquement sur la détection des anticorps (Ac) anti-VHC chez les patients, ne discriminant donc pas les personnes actuellement infectées par le virus de celles guéries naturellement ou médicalement. Le nombre de personnes atteintes par l'hépatite C serait donc plutôt compris entre 80 et 184 millions (Lavanchy D, 2011; Mohd Hanafiah K *et al.*, 2013; Gower E *et al.*, 2014), avec une incidence de 1,25 millions de personnes par an (Razavi, AASLD 2014 unpublished).



A : Prévalence basée sur les cas recensés

B : Prévalence basée sur les cas recensés et les estimations

Figure 11 : Prévalence mondiale du virus de l'hépatite C par pays en 2014
d'après (Gower E *et al.*, 2014)

La prévalence est très disparate dans le monde, comprenant des régions de faible endémie (prévalence inférieure à 1 %, comprenant l'Europe de l'ouest, l'Inde, l'Asie du sud), d'endémie modérée (prévalence entre 1 et 2 %, dont les Amériques, les pays de l'ancienne U.R.S.S, la Chine et l'Australie), jusqu'aux régions de forte endémie (prévalence supérieure à 5 % pour l'Afrique centrale et de l'ouest, la Mongolie, le Pakistan, l'Ouzbékistan, le Turkménistan, et l'Égypte). En France, la prévalence est estimée à moins de 1 % de la population, représentant entre 234 000 et 578 000 personnes infectées par le virus, avec une incidence annuelle minimum de 5000 nouveaux cas (Delarocque-Astagneau E *et al.*, 2010; Cornberg M *et al.*, 2011; Gower E *et al.*, 2014).

I.2. Transmission

Le VHC se transmet de manière interhumaine directe *via* l'échange de fluides sanguins, c'est-à-dire par tout acte permettant au virus de

passer au travers de la barrière cutanée ou des muqueuses. La réutilisation de matériel souillé (seringue, acupuncture, tatouage, infection iatrogène et partage de matériel servant à l'inhalation de drogues) constitue la voie principale de dissémination mondiale du virus. L'exemple le plus frappant a eu lieu en Égypte, où la réutilisation de seringues contaminées lors des vastes campagnes de traitement contre la schistosomiase entre les années 1950 à 1980 a provoqué la plus forte épidémie mondiale, élevant la prévalence du pays à 15 % (Guerra J *et al.*, 2012). Les autres facteurs de risque sont constitués, en fréquence d'observation décroissante, par les rapports sexuels violents et non-protégés, la transmission verticale et les accidents d'exposition au sang lors des activités de soins.

Au début des années 1990, le dépistage sérologique systématique des donneurs d'organes a été mis en place dans la majorité des pays développés suite à l'affaire du sang contaminé dans plusieurs pays, ayant pour conséquence une diminution très significative de l'incidence dans ces pays. La première source de contamination dans les pays développés est désormais la réutilisation de matériel contaminé lors de la prise de drogues, représentant en moyenne 58 % des nouveaux cas diagnostiqués entre 2010 et 2011 (Eurosurveillance editorial t, 2013).

I.3. Histoire naturelle de la maladie

Les 6 premiers mois suivant la contamination par le virus correspondent à la phase aiguë de l'infection, caractérisée par une forte augmentation de la concentration sanguine des alanine et aspartate aminotransférases. Cette phase est asymptomatique dans 70 à 85 % des cas, mais des symptômes non-spécifiques peuvent apparaître tels la léthargie, la myalgie, ou encore la jaunisse (Orland JR *et al.*, 2001). Le virus est détectable dans le sang circulant des patients dans le mois suivant la contamination.

Si le VHC est éradiqué naturellement dans 25 à 50 % des cas grâce au système immunitaire, principalement par la réponse spécifique des lymphocytes T, l'infection évolue vers une chronicité dans 50 à 75 % des cas et une fibrose hépatique peut survenir suite à l'inflammation du foie provoquée par la réponse immunitaire (**Figure 12**) (Pawlotsky JM, 2004; Micallef JM *et al.*, 2006). En effet, la réponse antivirale a pour conséquence de détruire les cellules infectées et engendre une cicatrisation récurrente du tissu qui remplace peu à peu les hépatocytes par des fibroblastes. De plus, les patients atteints de l'hépatite C présentent fréquemment une stéatose hépatique, dont la prévalence atteint 40 %, tous génotypes confondus (Rubbia-Brandt L *et al.*, 2000; Sharma P *et al.*, 2004).

Dans les 10 à 20 ans suivant l'établissement de l'infection chronique, l'hépatite peut évoluer dans 4 à 24 % des cas vers une cirrhose dont les effets sont irréversibles, puis vers un CHC dans 1 à 23 % des cas de cirrhose et avec une incidence annuelle de 1 à 4 % dès l'apparition de la cirrhose (NIH C, 2002; Westbrook RH and Dusheiko G, 2014). Le principal facteur de risque conduisant au CHC est constitué par la cirrhose elle-même, mais d'autres facteurs comme le génotype du VHC, le diabète, l'obésité, la prise excessive et régulière d'alcool, la co-infection par le virus de l'hépatite B ou par le virus de l'immunodéficience humaine sont également impliqués dans l'évolution de la maladie et pourraient expliquer les différences d'évolutions observées. L'hépatite C est responsable de 27 % des cirrhoses et 25 % des CHCs et a été la cause de 350 000 à 500 000 décès dans le monde en 2010 (Perz JF *et al.*, 2006; Lozano R *et al.*, 2012). L'évolution de la maladie étant très lente et la dissémination du virus toujours importante dans certaines régions du monde, ces chiffres tendront à augmenter dans les 10 prochaines années en dépit d'un traitement et/ou vaccin efficace(s) accessible(s) à tous.

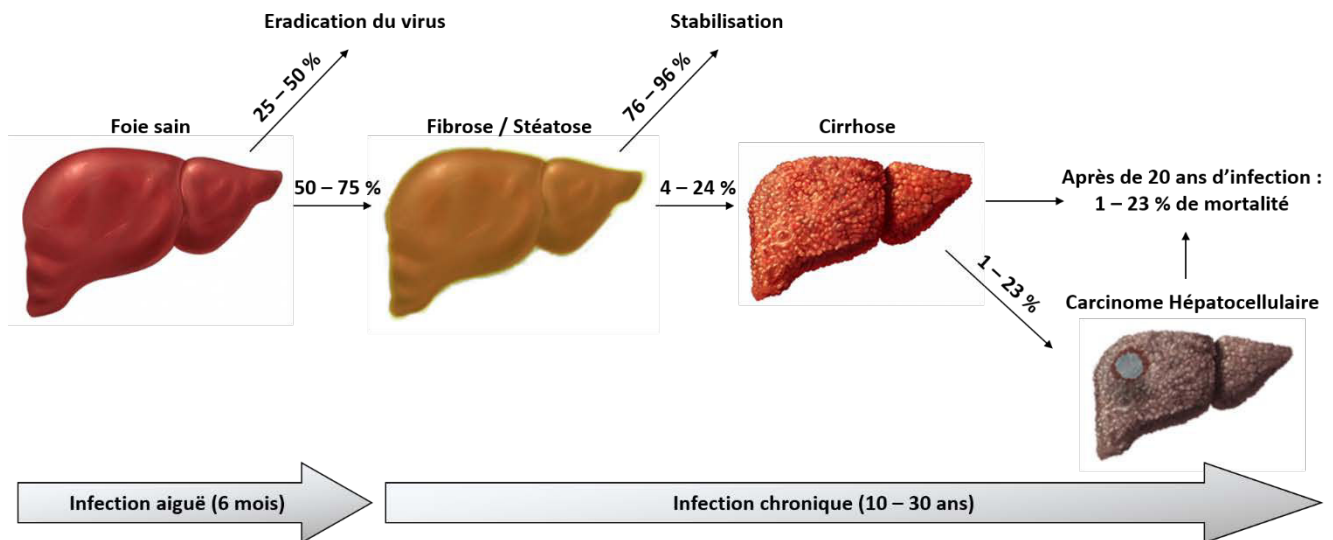


Figure 12 : Histoire naturelle de l'infection par le VHC

I.4. Variabilité génétique du virus

Les études du génome du VHC ont permis de le classer dans la famille des *Flaviviridae* qui est constituée de 3 genres : les Pestivirus, les Flavivirus et les Hepacivirus dont le VHC est le représentant majoritaire (Choo QL *et al.*, 1991). Le VHC était le seul représentant du genre *Hepacivirus* jusqu'à la découverte récente de nouveaux virus chez les rongeurs, nommé RHV pour « rodent hepacivirus », chez les canidés et les équidés, appelés NPHV pour « non-primate hepatitis C virus », ou encore le GB virus B chez divers primates non-Humains (Kapoor A *et al.*, 2011; Stapleton JT *et al.*, 2011; Burbelo PD *et al.*, 2012; Kapoor A *et al.*, 2013). Il existe une forte diversité du génome du VHC due à l'absence d'activité correctrice de sa polymérase NS5B, induisant l'apparition de mutations de l'ordre de $2,5 \cdot 10^{-5}$, par nucléotide et par cycle de réplication (Ribeiro RM *et al.*, 2012). Malgré le caractère aléatoire des mutations lors de la réplication virale, certaines régions du génome sont plus conservées que d'autres à cause de la pression de sélection. Les régions les plus conservées sont celles correspondant aux régions 5' et 3' non-codantes ainsi que la séquence codant la protéine de capsid (C) du VHC. A l'inverse, les séquences codant les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont les régions les plus soumises aux mutations, notamment au niveau de la région hyper variable (HVR)-1 d'E2. Ces mutations confèrent aux nouveaux virions un avantage sélectif certain, *via* un échappement à la réponse immunitaire spécifique (Farci P *et al.*, 1996; Prentoe J *et al.*, 2011). Il existe donc une

multitude de variants viraux coexistant au sein d'une personne infectée à un instant t donné, définissant le concept de quasi-espèce (Martell M *et al.*, 1992).

Afin de faciliter la caractérisation des différents groupes de variants et unifier leur nomenclature, une classification mondiale a été instaurée en 1993, puis ajustée plusieurs fois jusqu'en 2015 (Simmonds P *et al.*, 1993; Simmonds P *et al.*, 2005; Smith DB *et al.*, 2014; Murphy DG *et al.*, 2015). Les variants sont ainsi classés en 7 génotypes différents (de 1 à 7), avec plusieurs sous-types (67 en tout) en leur sein (a, b, c, etc...). Leur classification est organisée selon leur degré d'homologie (ou divergence) de leur séquence nucléotidique comme suit : les isolats d'un même génotype partagent 67 à 70 % d'homologie, ceux d'un sous-type, 75 à 80 % d'homologie, et au minimum 90 % d'homologie pour les quasi-espèces (Bukh J *et al.*, 1995).

De par cette diversité génétique, les différentes souches n'ont pas le même poids dans la pathogénèse et la réponse aux traitements. En effet, le génotype 1 est celui répondant le moins au traitement de première génération, tandis qu'une stéatose hépatique viro-induite est fréquemment observée chez les patients atteints d'un génotype 3. Au même titre que la prévalence, la distribution des génotypes dans le monde est hétérogène (Figure 13).

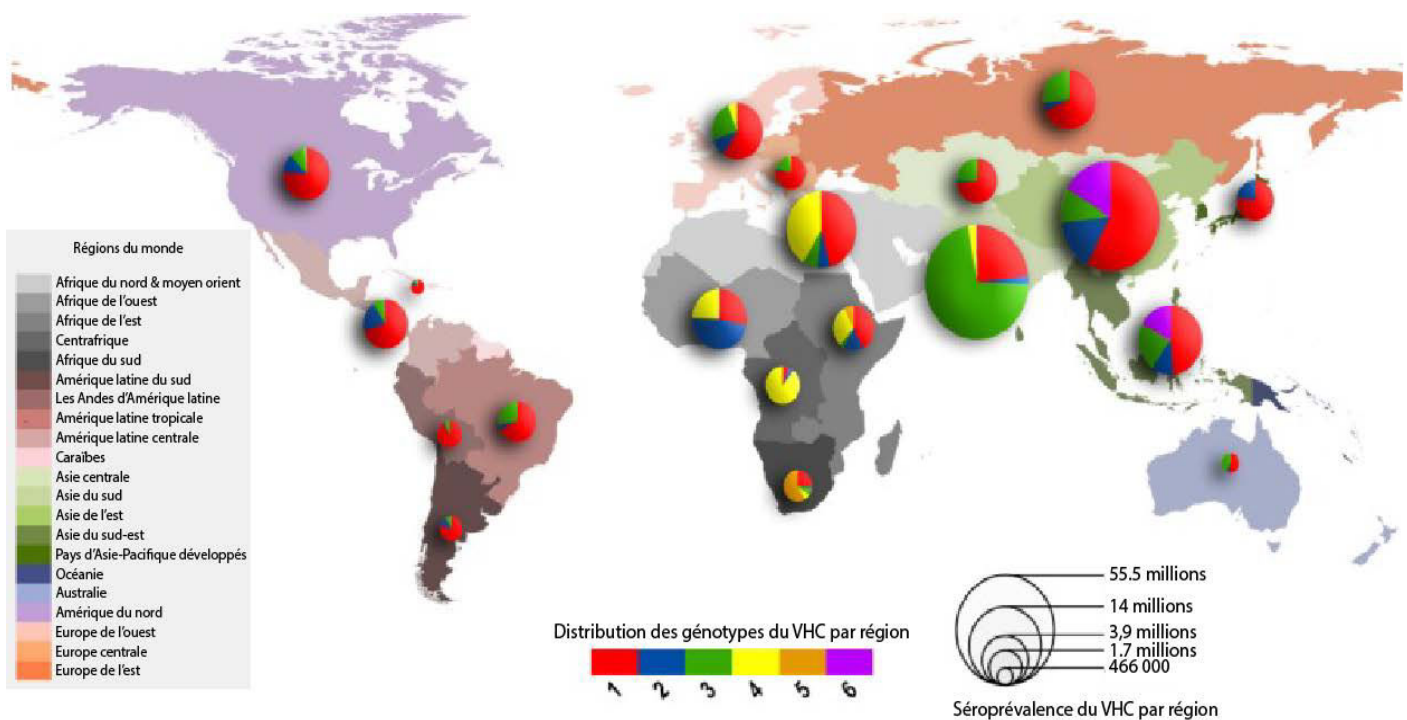


Figure 13 : Répartition des génotypes du VHC dans les régions du monde d'après (Messina JP *et al.*, 2015)

I.5. Dépistage

En France, seulement 24 % des personnes infectées par le virus étaient au fait de leur séropositivité en 1994, pour atteindre 62 % en 2009 (Meffre C *et al.*, 2010; Deuffic-Burban S *et al.*, 2012). Un tiers des personnes infectées ne seraient donc pas conscientes de leur séropositivité, constituant un frein majeur à l'éradication du virus et des pathologies associées. Afin de réduire la dissémination et l'ampleur de la maladie dans le monde, la généralisation du dépistage du VHC par un test de diagnostic rapide, sûr, pratique et peu onéreux serait le premier moyen de lutte. Des tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) comme l'OraQuick® (Lee SR *et al.*, 2010) ont été développés ces 5 dernières années permettant le dépistage du VHC en 40 min à partir d'un prélèvement buccal ou capillaire, avec une fiabilité de 98,1 ou 99,8 %, respectivement.

Le principal enjeu dans les pays peu développés est la réduction de la transmission du VHC par transfusion sanguine ou voie iatrogène, ainsi qu'une prise de conscience collective de la maladie, car malheureusement les traitements ont un coût trop élevé pour être prescrits systématiquement. En plus d'être moins chers de 30% par rapport au test RIBA (« Recombinant immunoblot assay »), l'avantage des TROD pour les pays peu développés réside dans le prélèvement qui peut être buccal, donc ne nécessite pas l'utilisation de seringue, limitant la contamination par du matériel souillé.

I.6. Traitements

I.6.A. Evolution des traitements antiviraux

Avant même l'identification en 1989 de l'agent responsable des hépatites dites « non-A non-B » et suite aux avancées du traitement de l'hépatite B, un premier traitement basé sur l'utilisation d'interféron-alpha (INF- α) pendant 24 semaines a été initié en 1984 (Hoofnagle JH *et al.*, 1986). Si cette monothérapie s'est révélée peu efficace, le traitement a été amélioré au fur et à mesure durant les 2 décennies suivantes pour constituer, aujourd'hui encore, le traitement mondial de référence. La première des améliorations a été l'ajout de Ribavirine au traitement, permettant une réponse immunitaire des patients plus soutenue (Brillanti S *et al.*, 1994), suivi de la pégylation de l'INF- α , c'est-à-dire l'ajout d'une molécule de polyéthylène glycol. Cette dernière peut-être soit linéaire et de 12 kDa (INF- α 2a), soit ramifiée et de 40 kDa (INF- α 2b), et a pour fonction d'augmenter la demi-

vie initiale de 7 h à 75 h pour l'INF- α 2a et à 30 h pour l'INF- α 2b (Glue P *et al.*, 2000; Manns MP *et al.*, 2001; Fried MW *et al.*, 2002).

Le traitement associant l'INF- α pégylé et la Ribavirine sur une durée de 48 semaines est devenu le traitement standard durant plus de 10 ans, permettant une éradication du virus dans 42 à 46 % des cas de génotype 1 et 76 à 82 % des génotypes 2 ou 3. Le protocole de traitement a cependant été optimisé quant à sa durée en fonction des patients et de leur réponse au traitement. Par exemple, le fait d'être infecté par le génotype 2 ou 3, ou de présenter une réponse antivirale rapide (clairance du virus dans les 4 premières semaines de traitement), permet d'ajuster le traitement à 24 semaines seulement (Moreno C *et al.*, 2010). A l'inverse, les patients présentant une réponse antivirale lente (encore virémiques à 12 semaines et avec une clairance à 24 semaines) ont une fenêtre de traitement prolongée jusqu'à 72 semaines (Berg T *et al.*, 2006). Cette optimisation du traitement permet à la fois de réduire le coût de la thérapie, mais surtout d'améliorer la qualité de vie du patient et de l'exposer le moins possible au traitement qui induit de lourds effets secondaires (dépressions, asthénies, myalgies, insomnies ou encore migraines) (Manns MP *et al.*, 2001). Enfin, il est à noter que l'initiation du traitement après l'entrée en cirrhose abaisse significativement le taux d'éradication du virus, mais néanmoins demeure toujours indiqué car permet de réduire de 33 % le risque de développer un CHC (Ikeda K *et al.*, 1999).

I.6.B. Dernière avancée : les antiviraux à action spécifique

Jusqu'à présent, le traitement visait à augmenter la réponse du système immunitaire du patient et inhibait la réplication virale de façon non spécifique. A partir de 2003, une nouvelle génération de médicaments a été développée, celle des antiviraux à action directe (DAA), ciblant directement les protéines virales (Lamarre D *et al.*, 2003). Les 2 premiers inhibiteurs moléculaires passant la phase III de développement ont été le Telaprevir et le Boceprevir, se fixant à la protéase NS3/NS4A du virus et inhibant donc la maturation de la polyprotéine virale et la réplication virale.

Malgré l'augmentation de la réponse observée lors du traitement avec l'une de ces molécules en trithérapie avec l'INF- α pégylé et la Ribavirine, ces DAA procurent une efficacité variable selon les génotypes ainsi qu'une faible barrière à la sélection de variants viraux résistants. En effet, la haute spécificité des DAAs pour la structure de leur domaine

cible ne permet pas leur fixation à ce dernier en cas de mutation. Par conséquent, leur utilisation a été restreinte au traitement contre le génotype 1 (Ghany MG *et al.*, 2011), mais pourrait être remise en cause car de récentes études ont révélé des effets secondaires plus fréquents et plus graves ainsi qu'une plus faible efficacité que ceux observés en phase III (Hezode C *et al.*, 2014).

En l'espace de 4 ans, plus d'une vingtaine de DAAs ont été développés, dont certains ont déjà été approuvés comme le Daclatasvir (anti NS5A), Dasabuvir et Sofosbuvir (anti NS5B), Simeprevir (anti NS3-NS4A) (Pawlotsky JM *et al.*, 2015). Au même titre que le Telaprevir et Boceprevir, ces derniers constituent la première génération des DAAs synthétisés n'offrant pas d'action antivirale pangénomique et/ou une faible barrière aux résistances. Cependant, la trithérapie incluant un DAA entraîne une éradication du virus dans 75 % des cas au minimum (génotype 1a, trithérapie avec Simeprevir) et jusqu'à 96 %, à condition de déterminer le génotype de la souche virale au préalable afin de sélectionner les DAAs les plus appropriés. Plusieurs traitements en associant une combinaison uniquement de DAAs ont été mis en place, et ont conduit à une efficacité dans plus de 90 % des cas pour les génotypes 1, 3 et 4 (Afdhal N *et al.*, 2014; Lawitz E *et al.*, 2014), prouvant la possibilité de s'affranchir de l'INF- α pégylé, et par conséquent de ses lourds effets secondaires ainsi que de l'administration du traitement par injection. Le nouveau traitement de référence pour le VHC de génotype 2 contient cependant toujours de la Ribavirine associée au Sofosbuvir. Des DAAs de seconde génération ont été synthétisés afin de pallier les limites des DAAs de première génération (faible barrière à la résistance et action génotypique-dépendante). Déjà en cours d'essais cliniques pour la plupart, elles constitueront très certainement les futurs traitements de référence permettant une guérison dans plus de 95 % des cas.

I.6.C. Vers un vaccin

Même si les nouveaux traitements sont très efficaces, le coût d'une thérapie de 12 semaines à base de DAA est élevé, entre 40 000 et 84 000 € selon les pays, et constitue une barrière certaine pour l'éradication mondiale du VHC (Ministère de la santé, 2014; Negro F, 2014). C'est pourquoi d'autres pistes sont toujours étudiées afin de lutter contre le VHC de façon efficace et accessible, y compris pour les pays peu développés. Par exemple, des molécules antivirales de la famille des flavonoïdes issues de plantes comme

le thé vert ont des propriétés antivirales. Leur capacité à inhiber de façon efficaces différentes étapes du cycle viral et leur coût de production relativement faible en font des candidats thérapeutiques intéressants (Haid S *et al.*, 2012; Vausselein T *et al.*, 2013; Calland N *et al.*, 2015). Une piste alternative est évidemment le développement d'un vaccin. A titre d'exemple, le vaccin contre la poliomyélite a été administré à 2,5 milliards d'enfants en 20 ans, pour un coût de 0,11 \$ par dose (Hagan LM *et al.*, 2013). La prophylaxie à l'aide d'un vaccin serait évidemment le meilleur moyen d'éradiquer le VHC car, peu onéreux, il peut être employé dans les régions les plus pauvres. Mais la mise au point d'un vaccin contre l'hépatite C demeure difficile, car il faut s'affranchir à la fois de la variation génotypique du virus et du taux de mutation élevé dans la région HVR1 de la glycoprotéine d'enveloppe E2 (Bassett SE *et al.*, 1999).

Néanmoins certains vaccins en cours de développement présentent des résultats encourageants. L'un d'entre eux a la particularité de procurer une immunité à la fois contre l'hépatite B (immunogène : antigène HBs, réponse aussi importante qu'avec le vaccin actuellement disponible) et contre les génotypes 1, 2 et 3 du VHC (immunogène : glycoprotéine d'enveloppe E2 de génotype 1a) (Beaumont E *et al.*, 2013). Son pouvoir immunogène a été confirmé *in vivo* chez le lapin (Beaumont E and Roingeard P, 2015), et les Ac générés permettent une neutralisation en culture cellulaire de 50 à 80 % des particules virales du VHC, selon le génotype.

II. Le Virus de l'Hépatite C

II.1. Structures des particules virales

II.1.A. Structure théorique du virus de l'hépatite C

Le VHC est un virus enveloppé dont la taille oscille entre 40 et 100 nm de diamètre (Kaito M *et al.*, 1994). Bien qu'il ait été identifié il y a 25 ans, sa structure exacte demeure indéfinie malgré les tentatives d'analyses ultrastructurales. Ceci est dû en grande partie à l'hétérogénéité des virions ainsi que leur association avec des lipoprotéines, comme l'a démontré la caractérisation des particules virales circulantes dans les sérums de patients (VHCser) (Andre P *et al.*, 2002). La forme putative du VHC repose essentiellement sur les observations réalisées sur les virus de la même famille, dont notamment celui de la dengue. Dans ce modèle, le génome du VHC serait contenu dans une capsidie icosaédrique

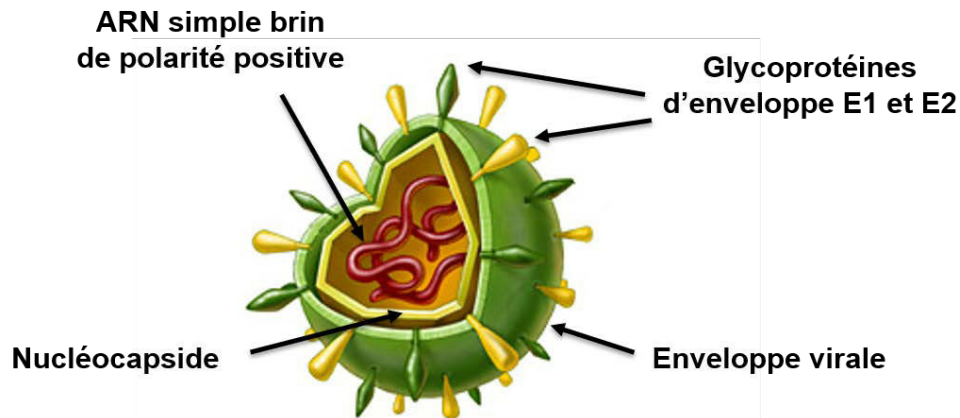


Figure 14 : Structure putative du VHC

de 30 à 35 nm de diamètre, elle-même entourée de l'enveloppe virale où sont enchassées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (**Figure 14**). Les données les plus récentes réfutent l'hypothèse d'une structure icosaédrique et décrivent des virions sphériques avec quelques pics en surface (Catanese MT *et al.*, 2013b). La structure du VHC divergerait donc des caractéristiques morphologiques des autres virus de la famille des *Flaviviridae*, à savoir une surface lisse, une structure icosaédrique et une taille invariable. Malgré les doutes qui subsistent sur l'organisation des particules, les constituants en revanche sont bien identifiés :

- L'enveloppe du VHC est une bicouche phospholipidique émanante de la membrane du RE de la cellule hôte, dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC qui forment un hétérodimère (Deleersnyder V *et al.*, 1997; Vieyres G *et al.*, 2010).
- La nucléocapside résulte de la polymérisation d'environ 200 molécules de protéine C mature entre elles, autour du génome viral (Pietschmann T *et al.*, 2009). Le génome du VHC est un ARN simple brin de polarité positive de 9,6 kilo bases (kb), codant les 10 protéines virales.

II.1.B. Structure du génome

Le génome du VHC est un ARN monocaténaire d'environ 9,6 kb et de polarité positive, pouvant de fait être directement traduit par la machinerie cellulaire de l'hépatocyte (Choo QL *et al.*, 1989). Cet ARN possède un cadre ouvert de lecture unique et est flanqué de deux régions non codantes en positions 5' (5'NCR) et 3' (3'NCR) (**Figure 15**).

II.1.B.a. Région 5' non codante

La région 5'NCR correspond aux 341 premiers nucléotides du génome et est très conservée entre les différentes souches. Cette région est essentielle à la fois pour l'initiation de la réplication du génome viral, mais aussi pour sa traduction. Elle est organisée en 4 domaines (de I à IV) très riches en structures tiges-boucles (Honda M *et al.*, 1999; Lukavsky PJ *et al.*, 2003). Le 1^{er} est impliqué uniquement dans la réplication du génome viral tandis que les autres participent également à la traduction. En effet, les domaines II, III et IV forment le site interne d'entrée du ribosome (IRES) permettant l'initiation de la traduction, et ce de façon indépendante à la coiffe (Wang C *et al.*, 1993). L'IRES permet la fixation de la sous-unité 40S des ribosomes afin de les acheminer au niveau du codon initiateur AUG au 342^e nucléotide (Pestova TV *et al.*, 1998). Ce nucléotide est situé au niveau de la dernière tige boucle du domaine IV et constitue le début de la séquence de la protéine C. La région 5'NCR permet également la fixation du micro ARN miR-122, indispensable lui aussi à la réplication virale et exprimé uniquement dans les hépatocytes (Jopling CL *et al.*, 2005; Henke JI *et al.*, 2008).

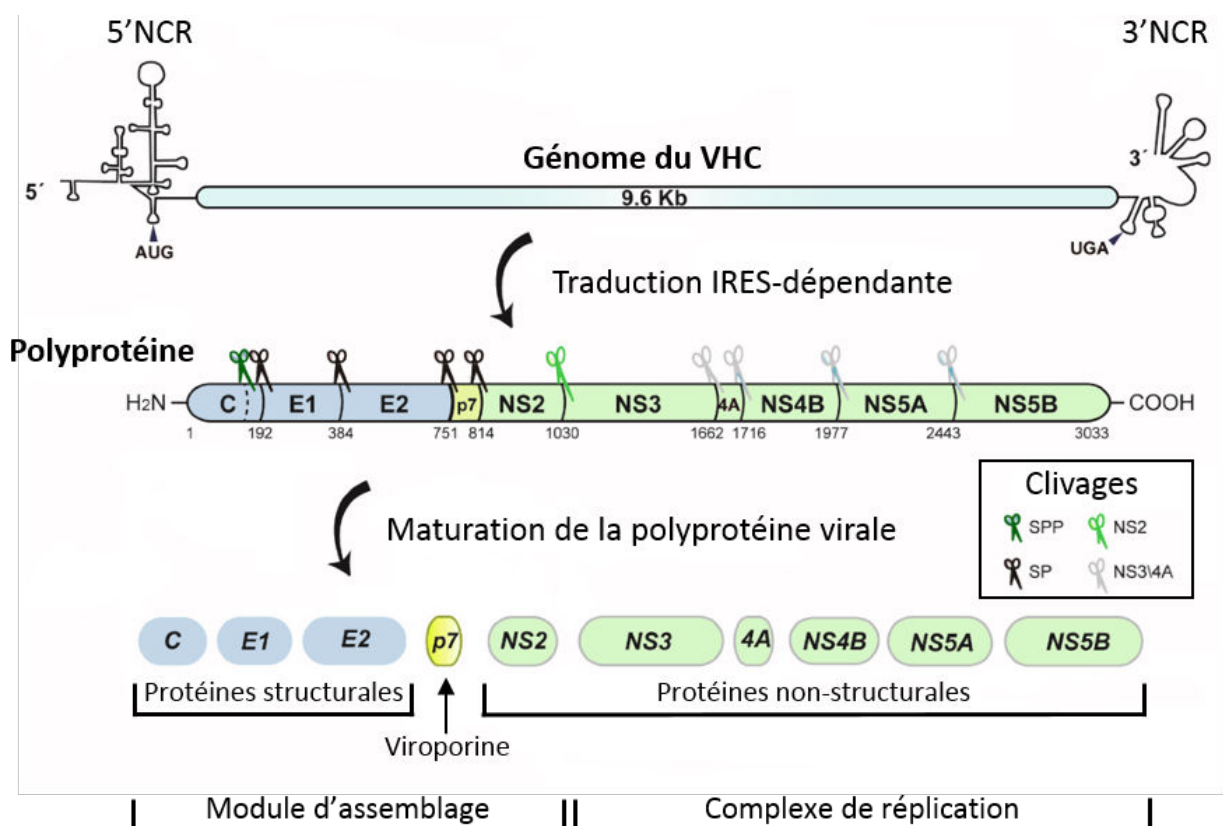


Figure 15 : Organisation génomique du VHC
d'après (Madan V and Bartenschlager R, 2015)

II.1.B.b. Région 3' non codante

La région 3' NCR débute après le codon STOP de la séquence codant la polyprotéine. Elle est moins conservée que la 5'NCR, mesure entre 200 et 235 nucléotides, et est organisée en 3 domaines. Le premier domaine est assez variable et mesure une cinquantaine de nucléotides, le deuxième possède un motif polyuracile/pyrimidine et le dernier, appelé X-tail, est très conservé (Kolykhalov AA *et al.*, 1996). Ce domaine X-tail est caractérisé par 3 tiges-boucles, dont la deuxième interagit avec l'ARN polymérase virale NS5B. Il permet d'initier la réplication à la fois du brin de polarité (+) et (-), en association avec les autres structures conservées de cette région (Kolykhalov AA *et al.*, 2000; Friebe P and Bartenschlager R, 2002; Friebe P *et al.*, 2005).

II.1.B.c. Région codante

Entre les deux régions non codantes se situe le cœur du génome viral, la région codante. Elle représente la majeure partie de l'ARN viral (entre 9024 et 9111 nucléotides) et son cadre unique de lecture permet la synthèse de la polyprotéine virale de plus de 3000 a.a. Cette polyprotéine subit plusieurs clivages enzymatiques, générant les protéines virales matures, comprenant : les protéines structurales (la protéine C, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2), la viroporine p7, et les protéines NS pour non-structurales (NS2, NS3, NS4A et B, NS5A et B). Les clivages sont opérés par des protéases cellulaires pour les protéines structurales et la viroporine, et des protéases virales pour les protéines non-structurales (**Figure 15**) (Bartenschlager R *et al.*, 2013).

II.1.C. Les différentes particules virales

II.1.C.a. Particules virales in vivo

Les particules virales apparaissent hétérogènes dans le sang circulant des patients infectés par le VHC, à la fois par leur taille, mesurant entre 20 et 100 nm (Kaito M *et al.*, 1994; Andre P *et al.*, 2002; Roingeard P *et al.*, 2004; Petit MA *et al.*, 2005), mais aussi par leur densité comprise entre 1,03 et 1,34 g/ml (**Figure 16**) (Thomssen R *et al.*, 1992; Thomssen R *et al.*, 1993). La densité des particules virales est fonction de leur teneur en

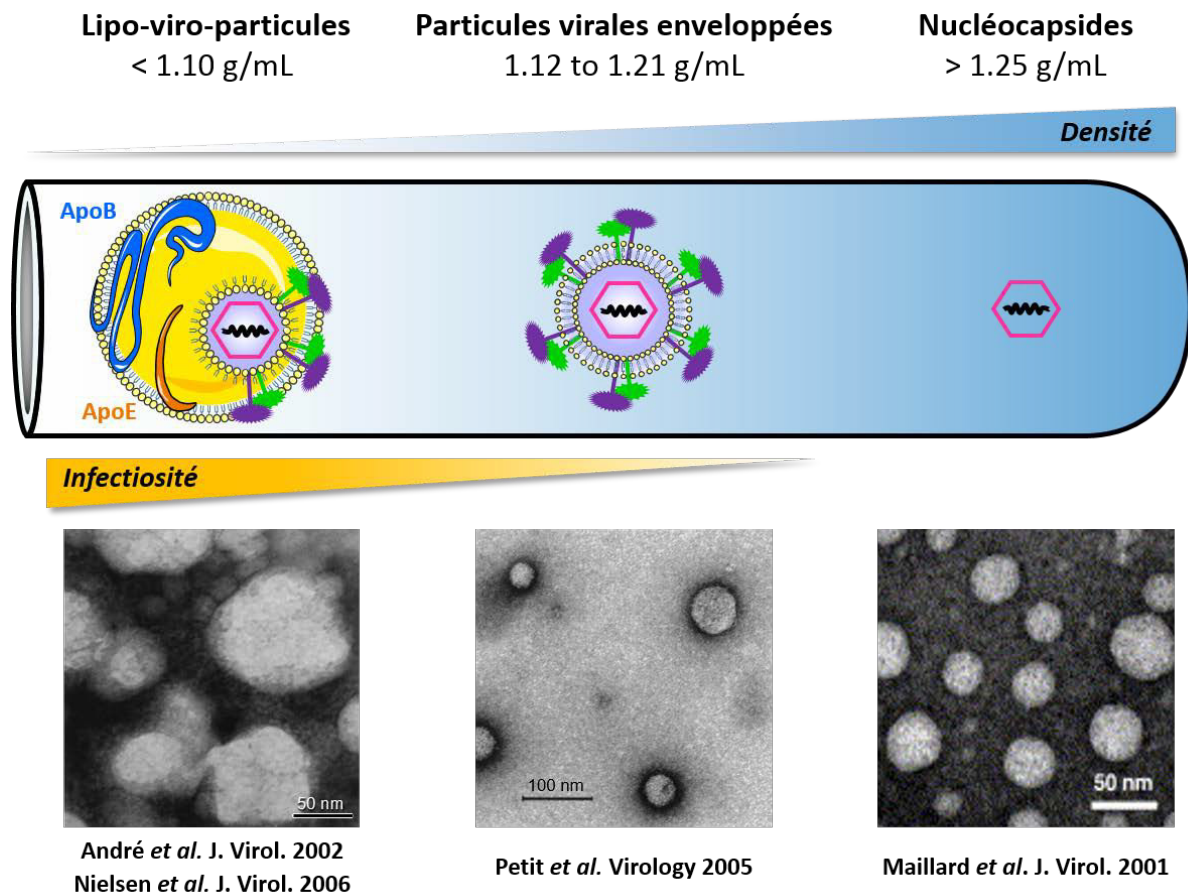


Figure 16 : Particules virales circulantes dans le sang des patients

lipides, donc de leur association avec les VLDLs essentiellement, mais aussi d'autres molécules contenues dans le sang comme des immunoglobulines. La fraction de plus forte densité, supérieure ou égale à 1,22 g/ml, correspondrait à des nucléocapsides non-enveloppées ou encore des complexes de petites tailles associant la capsidie et des Ac neutralisants (38 à 62 nm) (Hijikata M *et al.*, 1993b; Thomssen R *et al.*, 1993; Kanto T *et al.*, 1994; Maillard P *et al.*, 2006). Celles de densité comprise entre 1,12 et 1,21 g/ml ont une taille plus variable, entre 35 et 70 nm, et constituent les particules virales enveloppées « classiques ». Enfin, les particules d'une densité inférieure à 1,10 g/ml sont associées à des lipoprotéines riches en TAG et contenant l'ApoB, les LDLs et les VLVLs, formant des complexes appelés lipo-viro-particules (LVP) (Andre P *et al.*, 2002; Nielsen SU *et al.*, 2006). Leur structure est globulaire et irrégulière, affichant une taille moyenne de 100 nm. Lors d'expériences d'immunocaptures, il a été déterminé que ces LVPs sont associées aux ApoCI, CII, CIII et E, des Apos échangeables, en sus de l'ApoB, Apo non échangeable, et aussi à des immunoglobulines G et M (Andre P *et al.*, 2002; Diaz O *et al.*,

2006; Nielsen SU *et al.*, 2006; Huang H *et al.*, 2007b; Meunier JC *et al.*, 2008). Cette association originale du virus aux lipides lui confère un avantage certain, car l'infectiosité des particules virales est inversement proportionnelle à leur densité, comme cela a été observé *in vivo* chez le chimpanzé (Bradley D *et al.*, 1991; Hijikata M *et al.*, 1993b). Ces observations ont également été étayés dans un cas de transmission (Diaz O *et al.*, 2008). Il a été suggéré que seules les particules virales les moins denses auraient la capacité de se lier aux hépatocytes (Wunschmann S *et al.*, 2000), même si les bases moléculaires du gain d'infectiosité dû à l'association des particules virales avec les lipoprotéines demeurent encore largement incompris. De plus, cette association avec les lipoprotéines constituerait un mécanisme d'échappement au système immunitaire, par le camouflage de la particule virale.

L'étude des particules virales *in situ* dans les hépatocytes est rendue difficile par la faible proportion de cellules infectées aussi bien dans les biopsies hépatiques humaines qu'animales. En effet, les patients présentant une charge virale de 10^5 UI/ml n'affichent que 7 à 20 % de cellules infectées (Liang Y *et al.*, 2009). Néanmoins, les particules virales putatives d'une taille de 40 à 65 nm ont été visualisées dans des vésicules cytoplasmiques, des citernes du RE, ou encore sous forme libre dans le cytoplasme des hépatocytes infectés (Abe K *et al.*, 1989; Bosman C *et al.*, 1998; De Vos R *et al.*, 2002). De plus, la caractérisation des particules virales intra-hépatiques chez des chimpanzés chroniquement infectés a révélé deux pics d'ARN viral après centrifugation sur gradient de saccharose. Le premier pic est retrouvé à 1,06 g/ml et le second à 1,16 g/ml, et correspondraient respectivement aux particules enveloppées et aux virus nus (Hijikata M *et al.*, 1993b).

II.1.C.b. *Particules virales in vitro*

Les particules virales sécrétées en culture cellulaire, appelées VHCcc, affichent également une hétérogénéité de densité et de taille. Morphologiquement, elles sont plus sphériques que celles produites *in vivo*, et présentent deux populations majoritaires, dont les tailles moyennes sont de 60 nm et 45 nm (Wakita T *et al.*, 2005; Gastaminza P *et al.*, 2010). Les particules virales de plus petites tailles présentent une densité élevée et correspondraient aux particules non enveloppées. Les plus grandes, quant à elles, possèdent une bicouche phospholipidique qui constituerait leur enveloppe. Cela concorde avec leur densité

avoisinant 1,11 g/ml et leur caractère infectieux, propriétés donc proches des particules virales circulantes dites « classiques ». L'étude de VHCcc purifiées par Merz *et al.* a permis de déterminer la composition lipidique de ces particules. Le profil lipidique des VHCcc est à mi-chemin entre celui des VLDLs et des LDLs, constitué majoritairement d'esters de cholestérol, puis de PLs et de cholestérol, (Merz A *et al.*, 2011). Concernant la répartition des PLs, la PC est prépondérante avec une proportion toutes fois plus faible comparée à celles des VLDLs et LDLs, au profit de l'augmentation de sphingomyéline. Les expériences d'immunocaptures ont révélés que les VHCcc sont couplées à l'ApoE (Merz A *et al.*, 2011; Boyer A *et al.*, 2014), mais aussi à l'ApoB (Boyer A *et al.*, 2014). Ces associations ont été confirmés par leur visualisation en cryo-microscopie électronique, après marquage immunologique à l'or (Catanese MT *et al.*, 2013b). L'analyse de la densité des particules sécrétées par les Huh-7 infectées révèle que l'ApoB est sécrétée dans les plus faibles densités, pic à 1,03 g/ml, tandis qu'ApoE est majoritairement présente dans les densités plus élevées, vers 1,15 g/ml, et que l'infectiosité des particules virales est portée par les fractions entre ces deux pics de densité (Merz A *et al.*, 2011). L'immuno-capture de ces fractions, tantôt par des Ac anti-ApoB, tantôt par des anti-ApoE, permet la détection de l'ARN virale, confirmant l'association de l'ApoE et de l'ApoB avec les VHCcc. De plus, l'incubation des virions avec des Ac neutralisant anti-ApoB, comme anti-ApoE, permet d'inhiber significativement l'infection virale, suggérant un rôle de ces Apos dans l'infectiosité des particules virales (Merz A *et al.*, 2011; Boyer A *et al.*, 2014).

II.2. Cycle viral

L'absence de modèle de culture du virus jusqu'en 2005 a constitué un frein dans la compréhension du cycle viral (Wakita T *et al.*, 2005). Certaines étapes demeurent mal comprises et nécessitent d'être approfondies. Néanmoins, le cycle peut être disséqué en 6 étapes qui sont : (1) attachement et entrée virale, (2) décapsidation, (3) traduction et maturation des protéines virales, (4) réplication du génome viral, (5) morphogenèse virale, (6) maturation et sécrétion des virions (**Figure 17**).

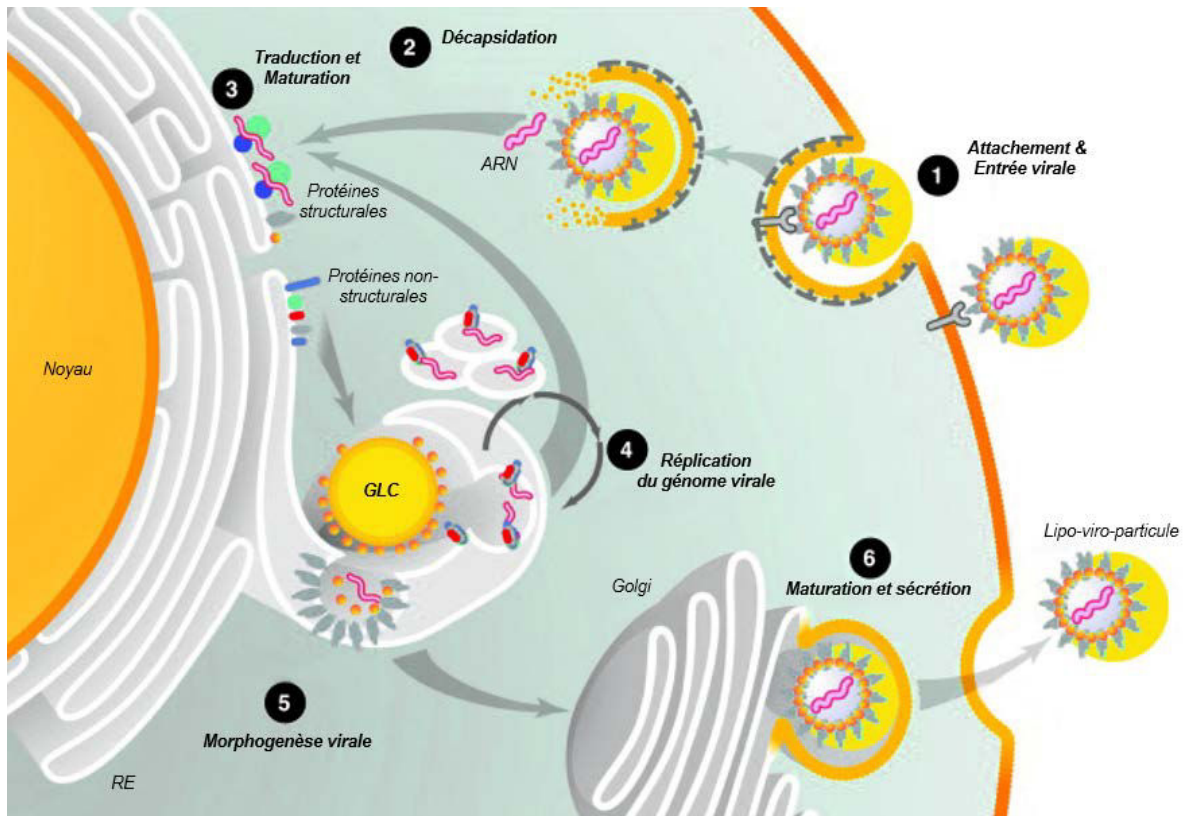


Figure 17 : Cycle viral du VHC
d'après (Herker E and Ott M, 2011)

II.2.A. Entrée virale

II.2.A.a. Attachement et facteurs cellulaires impliqués

Complexe et lente, l'entrée du VHC fait intervenir de nombreux récepteurs cellulaires et dépend de la composition des particules virales (**Figure 18**). En effet, les lipides associés aux LVPs sont des facteurs essentiels à l'entrée virale. Cette propriété inédite du VHC et le fait que sa réplication s'effectue majoritairement dans les hépatocytes expliqueraient en partie le tropisme du virus pour ces cellules.

II.2.A.a.i. Protéoglycanes à héparane sulfate

L'étape précoce d'attachement des LVPs fait intervenir un récepteur non-spécifique du VHC, mais spécifique des lipoprotéines, les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) (**Figure 18**). Les HSPGs font partie de la famille des glycosaminoglycanes et sont utilisés comme récepteurs d'entrée par plusieurs *Flaviviridae*, dont le virus de la dengue et le virus de la peste porcine classique (Hulst MM *et al.*, 2001; Lin LT *et al.*, 2013). Cependant, les LVPs n'interagissent qu'avec un groupe particulier d'HSPGs, les syndecans.

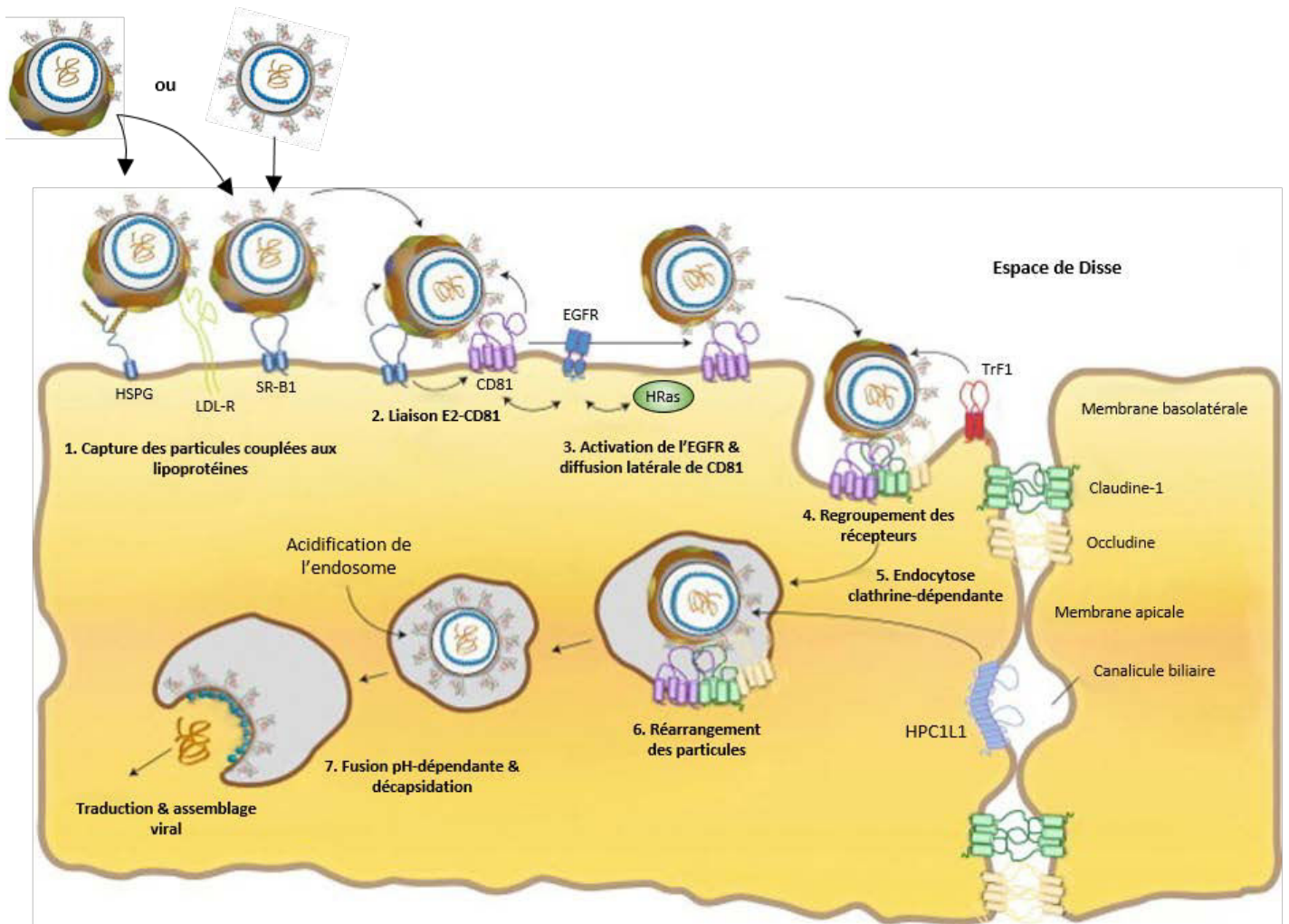


Figure 18 : Entrée virale
d'après (Douam F *et al.*, 2015)

Quatre syndecans ont été identifiés chez l'homme, dont seulement deux sont exprimés à la surface des hépatocytes : syndecan 1 et 4. Il était initialement pensé que les glycoprotéines d'enveloppe étaient la cible des syndecans (Barth H *et al.*, 2003), mais cela a été infirmé récemment en montrant qu'il s'agissait de l'ApoE contenue dans les LVPs (Jiang J *et al.*, 2013). Si syndecan 1 peut participer à l'entrée virale (Lin LT *et al.*, 2013), une étude récente a révélé que c'est majoritairement syndecan 4 qui est responsable de l'attachement des particules *via* ApoE (Lefevre M *et al.*, 2014). De façon intéressante, Lefevre et collaborateurs ont montré qu'un peptide homologue de la séquence du domaine de fixation de l'ApoE à l'HSPG pouvait inhiber par compétition l'infection par le VHC.

II.2.A.a.ii. Récepteur aux LDL cholestérol

Le LDL-R permet physiologiquement la clairance des lipoprotéines par liaison et internalisation des lipoprotéines transportant le cholestérol, l'ApoE et l'ApoB-100 (Hussain MM *et al.*, 1999). Néanmoins, les VLDLs ne peuvent se lier directement au LDL-R. Elles doivent subir au préalable l'action de la LPL afin de réduire leur contenu en TAGs, formant ainsi une lipoprotéine de densité intermédiaire (IDL), plus dense et capable de se fixer au LDL-R par sa molécule d'ApoB-100 ou d'ApoE (Chappel S *et al.*, 1998). L'ApoB-48 en revanche ne peut s'y fixer, car elle ne possède pas le domaine de liaison au LDL-R. Ce récepteur participe au métabolisme lipidique en permettant l'internalisation des lipoprotéines par endocytose via un mécanisme dépendant de la clathrine, qui conduira à leur dégradation (Goldstein JL *et al.*, 1985; Krul ES *et al.*, 1985). Dans les années 1990, la détection du génome du VHC associé aux lipoprotéines dans le sang circulant de patients avait suggéré l'utilisation du LDL-R comme récepteur d'entrée virale (Thomssen R *et al.*, 1992; Agnello V *et al.*, 1999). En 2007, il a été démontré en culture d'hépatocytes humains primaires (HHP) que la neutralisation ou la diminution d'expression du LDL-R, respectivement par le traitement avec des Ac anti-LDL-R ou avec du 25-hydroxycholestérol, inhibe l'infection par VHCser (Molina S *et al.*, 2007). Cette même étude prouve également que seules les particules virales de faibles densités, c'est-à-dire enrichies en lipides par leur association avec des lipoprotéines, ont la capacité de se fixer au LDL-R. Cette hypothèse est confortée par la diminution d'infection observée lors du traitement des LVPs par la LPL, qui induit une perte de ApoE et de TAGs dans les particules virales (Andreo U *et al.*, 2007; Shimizu Y *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que l'extinction du LDL-R était associée à une diminution de l'infection par le VHC (Owen DM *et al.*, 2009).

Cependant, une étude plus récente remet en cause le rôle de ce récepteur dans l'internalisation du VHC, par l'action conjointe de la LPL (Albecka A *et al.*, 2012). Les auteurs montrent que l'action de la LPL favorise la fixation des VHCcc au LDL-R, mais leur internalisation par ce processus ne constitue pas une voie productive pour le virus, bien qu'il augmente la quantité d'ARN viral intracellulaire. Cependant, le LDL-R est important dans le cycle infectieux du VHC, car son extinction impacte négativement la réplication virale. C'est son rôle dans l'incorporation des lipides qui semble être impliqué : l'inhibition

du LDL-R induit une augmentation de phosphatidyléthanolamine au détriment de la PC (Albecka A *et al.*, 2012), pouvant modifier l'intégrité des membranes du RE où la réplication du virus a lieu (Li Z *et al.*, 2006). Ces observations pourraient expliquer la réponse augmentée aux traitements antiviraux et la fréquence de guérison spontanée plus élevée qui ont été observées chez les patients présentant certaines mutations induisant une perte de fonction du LDL-R (Mas Marques A *et al.*, 2009). Ce récepteur est donc un facteur important dans l'entrée du VHC, contribuant également à la réplication virale. Il est cependant de moindre importance pour l'entrée des VHCcc, dû probablement par la plus faible teneur en lipide de ces particules.

II.2.A.a.iii. Récepteur scavenger de classe B type 1

Après les facteurs d'attachement non-spécifiques du VHC interviennent les récepteurs d'entrée spécifiques qui sont au nombre de quatre : le récepteur « scavenger » de classe B type 1 (SR-B1), le « cluster of differentiation 81 » (CD81), la claudine 1 (CLDN-1) et l'occludine (OCLN). SR-B1 est une glycoprotéine transmembranaire de 509 acides aminés (a.a) majoritairement exprimée dans le foie et les tissus stéroïdogéniques, et possède 2 domaines transmembranaires, 2 domaines cytoplasmiques et une boucle extracellulaire responsable de sa liaison avec le VHC et ses autres partenaires (Scarselli E *et al.*, 2002). SR-B1 fut décrit initialement comme un récepteur des HDLs, mais son étude a révélé qu'il pouvait fixer toutes les autres lipoprotéines, c'est-à-dire les VLDLs, IDLs, LDLs et LDLs oxydées (LDLox) (Acton SL *et al.*, 1994; Acton S *et al.*, 1996; Silver DL *et al.*, 2001). De façon particulière, la fixation des HDLs à SR-B1 permet le transfert du cholestérol directement à travers la membrane plasmique, sans dégrader les HDLs (Krieger M, 1999; Silver DL *et al.*, 2001).

SR-B1 a été identifié comme récepteur pour le VHC lors d'expériences de neutralisation avec des Ac anti-SR-B1 ou de fixation à l'aide de protéines E2 solubles (Scarselli E *et al.*, 2002; Bartosch B *et al.*, 2003b; Catanese MT *et al.*, 2007). De plus, la sous-expression de SR-B1 par des siRNA induit une diminution de l'infectiosité des particules virales, prouvant le rôle critique de ce récepteur dans le cycle infectieux du VHC (Zeisel MB *et al.*, 2007). De façon intéressante, il a été montré que la fixation des HCVser à SR-B1 pouvait être inhibée par compétition avec des VLDLs purifiées ou bien des Ac anti-ApoB (Maillard P *et al.*, 2006). Ceci indique que SR-B1 est capable de lier directement ou indirectement

les particules virales *via* E2 ou les VLDLs. Une étude récente indique que SR-B1 permet également la fixation des particules virales associées à d'autres lipoprotéines, dont l'ApoE (Dao Thi VL *et al.*, 2012). Selon ces auteurs, SR-B1 possède 3 fonctions distinctes dans l'entrée virales selon la densité des particules et le partenaire se liant au récepteur :

- il permet l'attachement des particules virales qui possèdent une densité entre 1,10 et 1,16 g/ml, et ce par une fixation indépendante d'E2.
- il induit une entrée fonctionnelle dans la cellule des particules virales de densité comprise entre 1,02 g/ml et 1,16 g/ml, toujours de façon indépendante à E2
- pour les particules virales de densité comprise entre 1,08 et 1,12 g/ml, il stimule l'infectiosité des particules virales de manière dépendante de la fixation d'E2 à SR-B1 respectivement par leur région HVR1 et domaine 1, qui sont indispensables pour la fixation.

La seule fixation du virus au récepteur ne suffit pas à induire le processus d'entrée et nécessite d'autres mécanismes moléculaires afin de l'initier (Douam F *et al.*, 2015). Un de ces mécanismes est l'incorporation de lipides à travers l'action simultanée de SR-B1 et du CD81, qui est connue pour favoriser l'entrée du virus (Bartosch B *et al.*, 2005; Dreux M *et al.*, 2006). En effet, la fonction particulière de SR-B1 qui permet l'incorporation des lipides à partir des HDLs sans induire leur dégradation constituerait un moteur pour l'entrée virale (Kapadia SB *et al.*, 2007). Cette hypothèse est étayée par les expériences bloquant l'activité de transfert lipidique de SR-B1, ce qui induit un blocage de l'entrée des particules virales, toutes densités confondues, et ce de façon indépendante de la liaison entre E2 et SR-B1 (Dao Thi VL *et al.*, 2012). SR-B1 pourrait y appauvrir la LVP en lipides, rendant alors accessibles les domaines d'E1 et E2. L'enrichissement des membranes en lipides permet un réarrangement de ces dernières et pourrait augmenter la fluidité ou l'accès des membranes à divers partenaires (Chapitre 1 : II.1.B). Dans le cas présent, la fluidité membranaire pourrait induire un mouvement des récepteurs, permettant leur rapprochement et ainsi la transition de la particule virale d'un récepteur à l'autre.

SR-B1 constitue donc un récepteur important dans l'entrée des particules virales, soit en permettant primitivement leur fixation, soit en favorisant leur infectiosité, et ce qu'elles soient associées ou non à des lipoprotéines. Des études approfondies sont requises afin d'élucider les mécanismes exacts d'action de SR-B1. Cependant, l'ensemble des données

déjà disponibles sur ces trois premiers récepteurs illustrent l'utilisation du métabolisme en faveur du VHC, favorisant son entrée et également sa réplication.

II.2.A.a.iv. CD81

Le CD81 fait partie de la famille des tétraspanines. Ces protéines sont caractérisées par 4 domaines transmembranaires, ainsi que de 2 boucles de tailles inégales et orientées vers le cytoplasme (van Spriel AB and Figdor CG, 2010). Ces molécules de surface s'associent entre elles ou avec d'autres récepteurs membranaires possédant des boucles et sont exprimées dans de nombreuses cellules. Historiquement, le CD81 est le premier récepteur du VHC à avoir été identifié lors d'expériences avec des fragments solubles d'E2 (Pileri P *et al.*, 1998). CD81 interagit avec E2 au niveau de sa plus grande boucle, appelée LEL pour « large extracellular loop » (Drummer HE *et al.*, 2002). Bien qu'il ait été démontré que l'inhibition de CD81 par extinction ou utilisation d'Ac neutralisants bloquait l'infection de toutes les particules virales, aucun des auteurs n'a décelé d'interaction directe entre CD81 et les LVPs (Bartosch B *et al.*, 2003a; Lavillette D *et al.*, 2005; Wakita T *et al.*, 2005; Zhong J *et al.*, 2005; Kapadia SB *et al.*, 2007; Kong L *et al.*, 2013; Khan AG *et al.*, 2014). En revanche, les pseudo-particules du VHC (VHCpp) sont inhibées lors de l'ajout d'Ac anti-CD81, car non couplées aux lipoprotéines, (Koutsoudakis G *et al.*, 2007). Ceci indique l'inaccessibilité d'E2 dans les particules virales infectieuses et implique un réarrangement des particules avant leur fixation au CD81, potentiellement par la délipidation des particules. Cependant, des expériences d'immuno-capture à l'aide de la LEL du CD81 ont permis de précipiter le complexe E1-E2 des VHCcc (Vieyres G *et al.*, 2010), suggérant un rôle de camouflage joué par les glycoprotéines d'enveloppe. Cela concorde avec l'augmentation de la fixation au CD81 des particules possédant des mutations au niveau d'E1 et/ou E2, indiquant l'importance de la conformation de l'hétérodimère pour l'entrée virale (Bankwitz D *et al.*, 2010; Douam F *et al.*, 2014).

Si le site de fixation à SR-B1 est connu, les sites de fixation d'E2 sur le CD81 demeuraient incertains jusqu'à récemment. Des études cristallographiques ont révélé que les régions comprises entre les a.a 504 et 522 ainsi que 604 et 624 étaient à l'origine de la fixation avec le CD81 (Kong L *et al.*, 2013; Khan AG *et al.*, 2014). De plus, ces deux régions formant des boucles, les données permettent de conforter les récentes observations, en accord avec la fonction de CD81 qui s'associe préférentiellement avec des structures de ce type.

La fixation du virus au CD81 est également importante pour l'internalisation des particules virales qui se déroule aux jonctions serrées des hépatocytes. En effet, le CD81 est exprimé sur la lame basale des hépatocytes, alors que l'internalisation est supposée se produire à la frontière entre les côtés apical et basal, c'est-à-dire aux jonctions serrées (**Figure 18**). Cette relocalisation est initiée lors de la fixation du virus sur le CD81 qui va induire une cascade de signalisation et ainsi la relocalisation du CD81, alors couplé au virus, au niveau du site d'internalisation par un mécanisme dépendant de l'actine (Brazzoli M *et al.*, 2008; Harris HJ *et al.*, 2008; Harris HJ *et al.*, 2010; Farquhar MJ *et al.*, 2012). Le déplacement de CD81 est initié par sa queue, activant les voies de signalisation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt, des MAPK, ainsi que des membres de la famille des Rabs (Chapitre 1 : II.1.C.b) (Brazzoli M *et al.*, 2008; Liu Z *et al.*, 2012). De façon intéressante, l'activation d'Akt active également les voies de la lipogenèse (Chapitre 1 : I.1.A), impliquant de fait CD81 dans le métabolisme lipidique.

II.2.A.a.v. Récepteur au facteur de croissance épidermique

Le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR), aussi appelé ErbB-1/HER1, est une glycoprotéine transmembranaire faisant partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Elle possède, comme toute protéine de cette famille, un seul domaine transmembranaire, une seule boucle extra-cytoplasmique constituant le domaine de fixation, et une queue cytoplasmique possédant la capacité à phosphoryler les protéines (Olayioye MA *et al.*, 2000). La fixation de son ligand implique sa dimérisation et active une voie de signalisation intracellulaire par la phosphorylation de la PI3K, rejoignant ainsi la cascade d'activation activant Akt et potentiellement la lipogenèse. EGFR constitue le dernier récepteur identifié en date à participer à l'entrée du VHC. L'équipe du Pr. Baumert a démontré que son extinction est responsable de l'inhibition de l'entrée du VHC à la fois en modèle Huh-7.5.1 et *in vivo* en modèle de souris avec foie humanisé (Lupberger J *et al.*, 2011). La sur-activation de l'EGFR par un ligand spécifique permet, à l'inverse, de favoriser l'infection dans ces 2 modèles. Contrairement aux autres récepteurs, l'EGFR ne permet pas la fixation du virus, mais promeut son déplacement au site d'internalisation, de manière dépendante du CD81. La fixation du VHC sur le CD81 est l'élément déclencheur de ce processus, activant l'EGFR en favorisant sa phosphorylation (Diao J *et al.*, 2012). L'EGFR, une fois activé, permet au cours de sa voie de signalisation

intracellulaire l'activation de HRas, une GTPase liée aux membranes. La continuité des travaux initiés par Lupberger J *et al.*, 2011 a mis en évidence l'association de HRas avec le CD81 lorsque ce dernier est associé à la membrane avec la CLDN-1 (Zona L *et al.*, 2013). HRas aurait donc un rôle pilote dans le trafic du complexe virus-CD81, cependant le mécanisme impliqué demeure inconnu.

II.2.A.b. Internalisation et facteurs cellulaires impliqués

Après la première phase d'attachement des particules virales, le processus d'internalisation va s'amorcer afin de former une vésicule d'endocytose dans laquelle sera contenue la particule virale toujours couplée au CD81. Au même titre que les vésicules d'endocytose formées à partir du LDL-R, celles-ci seront dépendantes de la clathrine, mais aussi de la dynamine (Blanchard E *et al.*, 2006; Meertens L *et al.*, 2006). Des expériences sur des cellules présentant tous les récepteurs précédemment décrits ne permettaient pas pour autant l'entrée virale, indiquant que d'autres facteurs sont requis (Bartosch B *et al.*, 2003b; Zhang J *et al.*, 2004). Ce sont deux études au sein du laboratoire du Pr. Rice qui ont permis d'identifier les deux derniers facteurs nécessaires à l'entrée virale. En effet, l'expression de la CLDN-1 et de l'OCLN dans des cellules HEK293T et NIH3T3 rend ces deux lignées susceptibles au VHC (Evans MJ *et al.*, 2007; Ploss A *et al.*, 2009). Ces deux protéines sont constitutivement exprimées dans les hépatocytes et sont des protéines de jonctions serrées, indispensables à l'organisation des hépatocytes en épithélium et donc à leurs fonctions d'adsorption et de sécrétion. Physiologiquement, CLDN-1 et OCLN sont exprimées de façon majoritaire du côté apical, mais l'infection par le VHC semblerait les relocaliser au niveau basal (Reynolds GM *et al.*, 2008), peut-être *via* HRas pour la CLDN-1.

II.2.A.b.i. Claudine 1

Les CLDNs sont des tétraspanines, donc capables d'interagir entre elles ou avec d'autres partenaires comme le CD81. La 1^{re} boucle extracellulaire de la CLDN-1, la plus longue, est celle permettant la fixation à la fois du virus et du CD81 au niveau de la LEL. Les données les plus récentes indiquent que la fixation de virus fait intervenir le complexe E1E2 dans son intégrité, car les molécules solubles d'E2 ne permettent pas la fixation à la CLDN-1 (Douam F *et al.*, 2014). E1 participe donc à cette interaction, soit directement en

interagissant avec la CLDN-1, soit indirectement par le changement de conformation qu'elle impose à E2 lorsqu'elles sont complexées. Il a été décrit que l'expression de la CLDN-1 aux jonctions serrées est cruciale pour l'infection virale, supposant que l'internalisation a donc lieu du côté apical (Yang W *et al.*, 2008; Liu S *et al.*, 2009). Cependant, l'interaction entre CD81 et la CLDN-1 a été observée très majoritairement au niveau des jonctions baso-latérales, et très peu aux jonctions apicales, suggérant que l'infection virale a lieu en fait au niveau baso-latéral (Harris HJ *et al.*, 2010; Davis C *et al.*, 2012; Farquhar MJ *et al.*, 2012). La CLDN-1 est également importante pour la formation de la vésicule d'endocytose, car le complexe qu'elle forme avec CD81 interagit avec les molécules de clathrine, et est indispensable à l'internalisation (Krieger SE *et al.*, 2010; Farquhar MJ *et al.*, 2012).

II.2.A.b.ii. Occludine

Cette protéine possède une composition équivalente à celles de la CLDN-1 et de l'EGFR, avec néanmoins une taille plus grande de ses boucles. Son rôle est peu connu dans le cycle du VHC, mais intervient comme la CLDN-1 après l'attachement de la particule virale. La fixation des particules sur ce récepteur est soumise à controverse car n'a été observée qu'au niveau du RE et non à la membrane cytoplasmique (Benedicto I *et al.*, 2008; Liu S *et al.*, 2010). De plus, l'OCLN n'est présente qu'au niveau des jonctions serrées, côté apical, or nous avons vu que le complexe CD81-virus-CLDN-1 est localisé du côté baso-latéral. Une autre observation confortant l'hypothèse que l'entrée virale se situe du côté baso-latéral s'ajoute à celles précédemment évoquées pour la CLDN-1. L'inhibition des jonctions serrées favorise l'entrée virale, montrant que la jonction en elle-même n'est pas cruciale à l'infection (Mee CJ *et al.*, 2008; Mee CJ *et al.*, 2009), mais peut toutefois favoriser l'accès du virus aux protéines composant les jonctions serrées. L'expression de l'OCLN demeure néanmoins cruciale pour l'infection du VHC. Même si l'OCLN ne s'associe pas aux glycoprotéines d'enveloppe, elle participe à la fusion grâce à sa deuxième boucle (Sourisseau M *et al.*, 2013). Les mécanismes impliquant l'OCLN demeurent donc non élucidés et requièrent d'être approfondis.

II.2.A.b.iii. Récepteur à la transferrine

Un autre récepteur semble contribuer à l'association de l'enveloppe du VHC au CD81, le récepteur à la transferrine 1 (TfR1), un des récepteurs responsables de l'adsorption hépatique du fer. Il est admis que les patients infectés par le VHC peuvent présenter une hémochromatose qui pourrait être dûe à la sous-expression du TfR1 observée dans les cellules infectées par le VHC (Martin DN and Uprichard SL, 2013). Cependant, l'inactivation de ce récepteur à l'aide d'Ac induit une inhibition de l'infection par le VHC. Les mécanismes impliqués restent à déterminer, mais il semblerait que ce soit l'étape d'internalisation du TfR1, gouverné par la protéine de trafic de TfR1, qui est impliquée dans l'entrée virale (Martin DN and Uprichard SL, 2013). Une action concertée entre les protéines de jonction et le TfR1 est supposée, mais non démontrée.

II.2.A.c. Transmission de cellule à cellule

Le virus peut également infecter une cellule naïve en shuntant une partie de la cascade de co-récepteurs précédemment décrite par la transmission de cellule à cellule (Timpe JM *et al.*, 2008; Witteveldt J *et al.*, 2009). Ce mode de transmission confère un avantage au virus en lui permettant d'échapper aussi bien au système immunitaire qu'à certains antiviraux (Brimacombe CL *et al.*, 2011; Catanese MT *et al.*, 2013a; Xiao F *et al.*, 2014). En effet, la synapse virologique a lieu au niveau apical entre les jonctions serrées, rendant les virions inaccessibles. C'est pourquoi l'utilisation d'inhibiteurs efficaces d'entrée virale, en association avec les DAAs, pourrait permettre une réponse antivirale proche de 100 % et limiterait l'apparition de variants viraux résistants (Xiao F *et al.*, 2015). Les récepteurs impliqués dans cette entrée alternative sont les récepteurs des jonctions serrées et de l'OCLN, CLDN-1 ainsi que SR-B1 (Timpe JM *et al.*, 2008; Witteveldt J *et al.*, 2009; Brimacombe CL *et al.*, 2011; Catanese MT *et al.*, 2013a). Catanese *et al.* ont cependant montré que SR-B1 n'est pas indispensable à ce processus. Des mutations sur E1 et E2, engendrant une perte de fixation à SR-B1, induisent une augmentation de transmission de cellule à cellule, alors que des inhibiteurs du SR-B1 entravent cette voie. L'implication du CD81 est également controversée, tantôt facultative (Timpe JM *et al.*, 2008; Witteveldt J *et al.*, 2009), tantôt indispensable (Brimacombe CL *et al.*, 2011; Catanese MT *et al.*, 2013a). Le récepteur de Nieman-Pick C1-like1 (NPC1L1), en plus de sa fonction dans le

remaniement tardif des endosomes, est en revanche crucial pour cette entrée permettant la diffusion du virus entre les cellules (Barretto N *et al.*, 2014).

Le TfR1, quant à lui, semble peu impliqué dans cette seconde voie d'entrée virale, mais peu de choses étant connues sur son action dans l'entrée virale, les auteurs ne réfutent pas catégoriquement une implication potentielle de ce récepteur (Martin DN and Uprichard SL, 2013).

En somme, ce processus d'entrée ne semblerait pas impliquer de façon certaine des récepteurs lipidiques, suggérant ici une indépendance du VHC vis-à-vis des lipides (Barretto N *et al.*, 2014). Cependant, deux études récentes incriminent ApoE comme un facteur nécessaire à cette transmission (Hueging K *et al.*, 2014; Gondar V *et al.*, 2015). ApoE ne serait pas impliquée dans l'attachement ou la pénétration du virus dans la cellule naïve, mais dans la morphogénèse tardive des particules virales dans la cellule déjà infectée. Par ailleurs, l'inhibition d'ApoB n'a révélé aucun impact sur l'ensemble de cette voie. ApoE inciterait donc les particules virales à emprunter la transmission cellule-cellule.

II.2.A.d. Fusion

La vésicule d'endocytose une fois formée et internalisée va fusionner avec l'enveloppe virale permettant la libération de la nucléocapside virale. La fusion est un mécanisme commun aux virus enveloppés et fait intervenir un peptide de fusion qui initie l'échange de la membrane cellulaire avec celle du virus. L'association des membranes se fait par héli-fusion, c'est-à-dire que le feuillet interne de la membrane cellulaire s'associera avec le feuillet externe de l'enveloppe du virus. Pour certains virus, il est nécessaire que le pH intra-vésiculaire s'acidifie afin d'activer la protéine de fusion. Ce changement de pH est opéré par la fusion de la vésicule avec d'autre(s) endosome(s). La protéine de fusion pour le VHC n'a pas été identifiée, mais il est suggéré que cette fonction revient à E2 et/ou E1, qui présentent une homologie structurelle avec les protéines de fusion d'autres virus de la famille des *Flaviviridae* (Krey T *et al.*, 2010; Douam F *et al.*, 2015). La modification de pH est cependant nécessaire à la libération de la capsid, comme démontré lors de traitements par des inhibiteurs d'acidification des endosomes qui induisent un blocage de l'infection par le VHC (Blanchard E *et al.*, 2006; Koutsoudakis G *et al.*, 2006; Sharma NR *et al.*, 2011). Dans des expériences de fusion avec des particules VHCcc, l'acidité atteint un

pH de 4,0 afin de permettre la fusion (Haid S *et al.*, 2009). Le modèle HCVpp a permis de déterminer que la fusion s'opère dans les endosomes précoces, car ils présentent uniquement Rab5, et non Rab7, à leur surface (*cf.* Chapitre 1 : II.1.C.b) (Meertens L *et al.*, 2006).

Mais le pH n'est pas la seule modification impliquée dans l'étape de fusion. Des réarrangements lipidiques pré-fusion peuvent également survenir :

- Un premier réarrangement, dit précoce, est orchestré par le récepteur SR-B1. En effet, sa deuxième fonction dans l'entrée virale est de permettre une entrée fonctionnelle des particules virales entre 1,02 et 1,16 g/ml, et ce de façon indépendante de la liaison avec E2 (*cf.* II.2.A.a.iii, page 59). SR-B1 assurerait cette fonction par sa capacité à transférer les lipides depuis les HDLs vers la particule virale, en particulier l'ApoC1 (Meunier JC *et al.*, 2005; Dreux M *et al.*, 2007). Cette lipodation favoriserait la fusion par des réarrangements fusogéniques des particules virales (Dao Thi VL *et al.*, 2012).

- Un second réarrangement, plus tardif mais impliquant également le métabolisme lipidique, fait intervenir NPC1L1. C'est un récepteur très long possédant 13 domaines transmembranaires et responsable de l'absorption du cholestérol et de son homéostasie. Il est principalement exprimé dans les entérocytes et les hépatocytes, au niveau apical. Son expression est diminuée dans les cellules infectées et son inhibition réduit l'entrée virale (Sainz B, Jr. *et al.*, 2012). Les auteurs ont pu démontrer que NPC1L1 intervient dans la fusion du virus et peut être inhibée pharmacologiquement, affectant l'infection virale aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Son action fondamentale dans le cycle viral est l'enrichissement des particules virales en cholestérol ce qui favorise la fusion de l'enveloppe (Lavillette D *et al.*, 2006; Haid S *et al.*, 2009).

La fusion aboutit à la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme où elle sera déshabillée par un mécanisme encore non identifié, libérant ainsi le génome viral.

II.2.B. Traduction de la polyprotéine virale

Une fois la décapsidation effectuée, le génome viral est libre et peut être traduit directement, étant un ARN simple brin de polarité positive. Nous avons vu que la sous-unité ribosomale cellulaire 40S se fixe sur l'IRES afin de débiter la traduction (**Figure 19**), mais d'autres facteurs sont nécessaires afin de poursuivre cette étape. Une fois la sous-

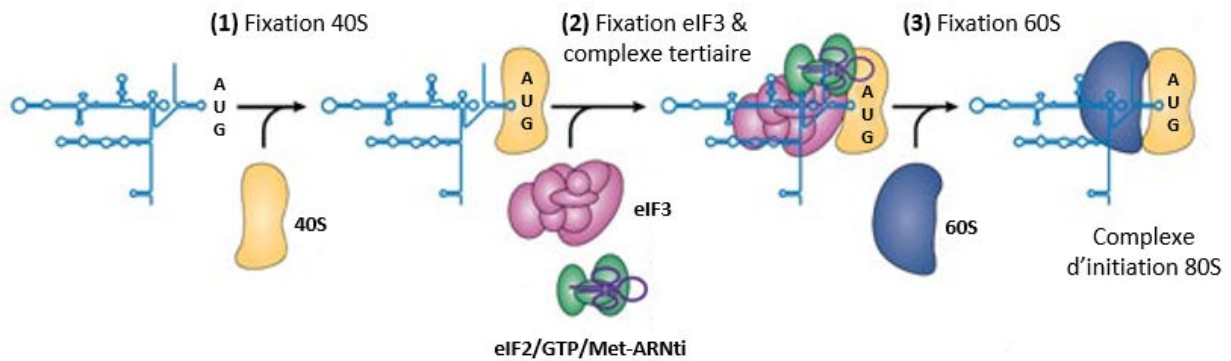


Figure 19 : Initiation de la traduction du VHC
d'après (Fraser CS and Doudna JA, 2007)

unité 40S localisée sur le codon AUG, ce complexe se voit associé au facteur d'initiation eIF3 (« eukaryotic translation initiation factor ») et au complexe tertiaire eIF2/GTP/Met-ARNTi, formant ainsi le complexe 48S (Kolupaeva VG *et al.*, 2000; Spahn CM *et al.*, 2001). La fixation d'eIF3 et du complexe tertiaire n'est que transitoire car ils sont hydrolysés par des GTPases, libérant ainsi eIF2-GDP, puis eIF3. Cela permet à la sous-unité ribosomale 60S de se fixer et former avec la sous-unité 40S le complexe de réplication. La traduction peut ainsi débuter et aboutir à la synthèse de la polyprotéine. Ce mode de traduction de la polyprotéine virale n'obéit pas au schéma classique chez les eucaryotes, mais se rapproche plus du mode de traduction chez les procaryotes (Wang C *et al.*, 1993; Pestova TV *et al.*, 1998). Il est à noter qu'il existe sur la séquence de la protéine C un décalage dans le cadre ouvert de lecture, pouvant générer une protéine structurale additionnelle appelée ARFP (« alternative ribosomal frameshift protein ») (Roussel J *et al.*, 2003).

II.2.C. Maturation de la polyprotéine virale

Au cours de sa synthèse, la polyprotéine est adressée au RE. Cet adressage est dû à la présence d'un premier peptide signal à la jonction C-E1 dans la séquence de la polyprotéine, permettant sa translocation dans la lumière du RE. La maturation de la polyprotéine est réalisée par l'action de 4 protéases qui clivent les extrémités des protéines, permettant leur libération. La première protéase à intervenir est la signal peptidase (SP) de la cellule hôte, située dans la lumière du RE (**Figure 20**). Elle libère les protéines structurales en catalysant les clivages aux jonctions C-E1, E1-E2, E2-P7, et finalement p7-NS2 (Lin C *et al.*, 1994). La protéine C n'est cependant pas encore mature et nécessite le clivage par une seconde enzyme cellulaire, la signal peptide-peptidase

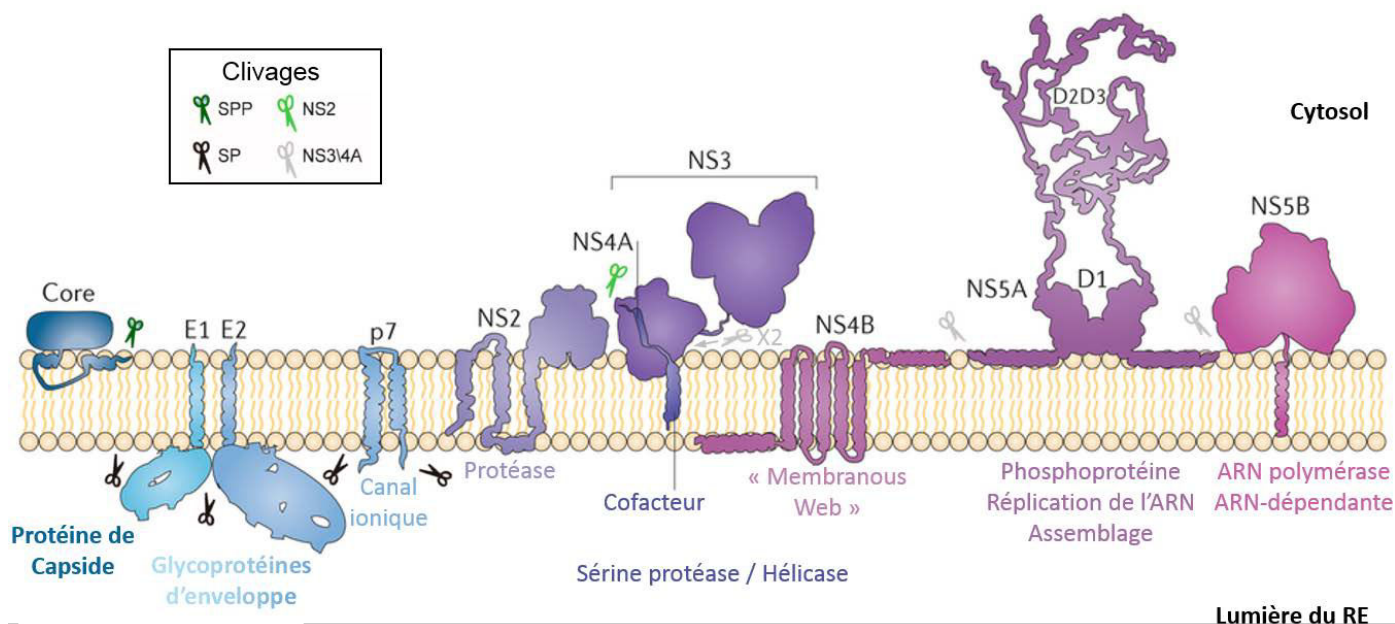


Figure 20 : Topologie des protéines virales matures et leur(s) fonction(s)
d'après (Bartenschlager R *et al.*, 2013)

(SPP), comme nous le verrons plus tard (*cf.* II.2.C.a). Une fois le domaine Amino- (N-)terminal de NS2 clivé, la jonction NS2-NS3 est clivée par l'activité auto-protéasique de NS2, constituant donc la première protéase virale (Grakoui A *et al.*, 1993; Hijikata M *et al.*, 1993a). Le clivage des autres protéines non-structurales, NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A et NS5A-NS5B, est assuré par le domaine sérine protéase de NS3 en association avec son cofacteur NS4A (Bartenschlager R *et al.*, 1994).

II.2.C.a. Protéine de Capside

La protéine C est l'une des plus conservées du génome du VHC avec 69 % d'a.a identiques entre les différentes souches (Bukh J *et al.*, 1994). Il existe 2 formes de la protéine C du VHC. Celle constituant les particules virales a un poids moléculaire apparent de 21 kDa sur gel de polyacrylamide : c'est la forme dite mature de la protéine (p21). L'extrémité C-terminale de sa séquence n'est pas encore connue de façon certaine, mais serait située au 177^e a.a selon la littérature la plus récente (Kopp M *et al.*, 2010). En revanche, la forme immature de la protéine C, dont le poids moléculaire apparent est de 23 kDa (p23), est bien connue, s'achevant au 191^e a.a. La protéine C du VHC est constituée de 3 domaines, définis selon leur hydrophobicité :

- le domaine D1, constitué des 119 premiers a.a de la protéine C, est responsable de l'oligomérisation de la protéine lors de la morphogénèse de la capsid virale (Yan BS *et*

al., 1998). Ce domaine riche en résidus basiques lui confère également une activité chaperonne pour l'ARN génomique du VHC, ce qui induit l'encapsidation (Shimoike T *et al.*, 1999; Steinmann E *et al.*, 2008). D1 est également capable de se lier avec la tubuline et favoriser la polymérisation des microtubules *in vitro* (Roohvand F *et al.*, 2009).

- le domaine D2, du 119^e au 173^e a.a, est hydrophobe et responsable de la localisation de la protéine C aux GLCs, qui est cruciale dans la formation de particules virales infectieuses, et ce de manière indépendante au domaine D1 (Boulant S *et al.*, 2007; Miyanari Y *et al.*, 2007). DGAT1 (Chapitre 1 : I.1.B) est également responsable de la localisation de la protéine C à la surface des GLCs. En effet, l'inhibition de DGAT1 entraîne une perte de localisation de la protéine C à la surface des GLCs, associée à une diminution de la production de virus infectieux (Herker E *et al.*, 2010). De plus ces deux protéines interagissent directement, comme l'ont démontré les expériences de co-immunoprécipitations. D2 permet également l'interaction de la protéine C mature avec la membrane du RE et des mitochondries (Hope RG and McLauchlan J, 2000; Schwer B *et al.*, 2004).

- le domaine D3, du 173^e au 191^e a.a, hautement hydrophobe, constitue le peptide signal d'E1 et sert de domaine transmembranaire à la p23. Ce domaine assure donc à la fois la translocation de la polyprotéine virale en cours de synthèse et l'ancrage de la p23 dans la membrane du RE.

Nous avons vu précédemment que la SP sépare la p23 de la glycoprotéine d'enveloppe E1, mais ne suffit pas pour aboutir à une protéine C mature. Pour ce faire, l'action de la SPP, enzyme localisée au sein de la membrane du RE, est requise. La SPP clive la p23 potentiellement en position 177, donnant naissance à la p21, dite mature (Lemberg MK and Martoglio B, 2002; McLauchlan J *et al.*, 2002). Privée de son domaine transmembranaire, cette dernière est alors libre de diffuser aux GLCs. Des travaux au laboratoire ont déterminé que le clivage par la SPP ne peut avoir lieu que si, et seulement si, la SP clive en amont la polyprotéine virale pour libérer la p23 (Pene V *et al.*, 2009).

La localisation subcellulaire de la protéine C est multiple, lui conférant ainsi plusieurs fonctions et un rôle central dans la morphogénèse du VHC. Elle est localisée de façon majoritaire aux GLCs, puis dans une moindre mesure au RE, et plus rarement retrouvée aux mitochondries ou au noyau (Moradpour D *et al.*, 1996; Dubuisson J *et al.*, 2002;

Miyanari Y *et al.*, 2007; Boson B *et al.*, 2011). La fréquence de ces différentes localisations subcellulaires semble dépendante de nombreux paramètres, dont principalement le génotype viral, le type cellulaire dans lequel la protéine est exprimée, et selon que tout ou partie du génome est exprimé. La fonction primaire de la protéine C est de constituer la capsid virale par oligomérisation grâce à son domaine D1. Compte tenu du fait que la protéine C recrute également l'ARN viral par son domaine D1 (Cristofari G *et al.*, 2004; Boulant S *et al.*, 2005), il est supposé qu'elle permet la localisation de tous les constituants viraux permettant la morphogénèse des nouvelles particules virales au site d'assemblage. La palmitoylation de la protéine C en position 172 est d'ailleurs importante pour son recrutement à la membrane du RE lisse ou du RE en liaison intime avec les GLCs (Majeau N *et al.*, 2009).

II.2.C.b. Protéine F

Il peut survenir un décalage dans le cadre de lecture lors de la traduction de la polyprotéine. Il en résulte la synthèse de la protéine F ou ARF, soulevant l'existence d'un site alternatif d'initiation de la traduction (Branch AD *et al.*, 2005). ARF semble également être synthétisée *in vivo*, des Ac spécifiquement dirigés contre elle ayant été retrouvés dans le sang des patients chroniquement infectés (Xu Z *et al.*, 2001; Shehat MG *et al.*, 2015). Cette protéine possède un poids moléculaire apparent de 17 kDa, variant selon le génotype, mais d'une longueur maximale de 160 a.a (Boulant S *et al.*, 2003). Elle ne semble pas être indispensable à la production virale, même si elle intervient dans la réplication virale (McMullan LK *et al.*, 2007; Vassilaki N *et al.*, 2008). Elle serait en revanche impliquée dans la pathogénèse induite par le VHC, notamment l'inflammation et la carcinogénèse (Fiorucci M *et al.*, 2007; Kong J *et al.*, 2009). De façon intéressante, elle est capable de se lier à la sous-unité alpha du protéasome, et régulerait ainsi la dégradation des protéines (Yuksekk K *et al.*, 2009).

II.2.C.c. Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

E1 et E2 sont des glycoprotéines d'enveloppe de type 1, ayant une taille apparente respective sur gel de 31 et 70 kDa. Elles forment un hétérodimère non covalent et sont les seules protéines du VHC à être orientées dans la lumière du RE (Dubuisson J *et al.*, 1994; Deleersnyder V *et al.*, 1997). L'hétérodimère est stabilisé par des ponts disulfures entre

les deux protéines au niveau de leur domaine transmembranaire, ce dernier assurant leur ancrage à la membrane du RE (Cocquerel L *et al.*, 2000; Op De Beeck A *et al.*, 2000; Vieyres G *et al.*, 2010). Les liaisons disulfures sont importantes dans l'entrée virale, mais aussi dans le bourgeonnement viral (Wahid A *et al.*, 2013). E1 et E2 sont fortement glycosylées, essentiellement sur des sites de N-glycosylations, et ces sites sont les plus conservés dans leur séquence. Les glycosylations assurent le repliement des glycoprotéines et leur attachement aux récepteurs membranaires, mais constituent également la cible des Ac neutralisants (Goffard A *et al.*, 2005; Falkowska E *et al.*, 2007; Helle F *et al.*, 2010). La structure d'E1 demeure peu décrite, tandis qu'une structure tertiaire a été proposée pour E2, décrivant 3 domaines distincts, nommés D1 à D3 (Krey T *et al.*, 2010). D1, situé du côté N-terminal de la protéine, participe à la fixation des particules virales à la membrane et contient la région HVR1 impliquée dans l'échappement à la réponse immunitaire (Pawlotsky JM *et al.*, 1999; Grahovac B *et al.*, 2000). D2 comprend la région HVR2 intervenant dans la fixation au CD81, et D3 jouerait un rôle dans la modification de la conformation spatiale lors de la fusion, de par son association à D1 *via* la région variable inter-génotypique (Roccasecca R *et al.*, 2003; Krey T *et al.*, 2010). Enfin, il a été montré récemment que les glycoprotéines E1 et E2 interagissent avec l'ApoB et/ou l'ApoE, les désignant comme acteurs de la morphogénèse virale (Merz A *et al.*, 2011; Catanese MT *et al.*, 2013b; Boyer A *et al.*, 2014; Lee JY *et al.*, 2014).

II.2.C.d. Protéine virale p7

La protéine p7 est une viroporine de classe IIA d'une longueur de 63 a.a et formant deux domaines transmembranaires séparés par une boucle cytoplasmique (Carrere-Kremer S *et al.*, 2002). Ses 2 extrémités C- et N-terminales sont donc localisées dans la lumière du RE. Bien que p7 soit classée dans les protéines structurales, sa présence au sein des particules virales n'a pas été démontrée à ce jour, mais elle participe de façon certaine à la morphogénèse virale (Steinmann E *et al.*, 2007; Wozniak AL *et al.*, 2010). Etant une viroporine, elle peut s'assembler en hexa- ou heptamères afin de former un canal ionique de 42 kDa (Clarke D *et al.*, 2006). Ce canal permettrait de réguler le pH entre le RE et le cytoplasme, favorisant l'assemblage des particules en empêchant une modification conformationnelle des glycoprotéines E1 et E2, et permettant ainsi la sécrétion de particules virales infectieuses (Steinmann E and Pietschmann T, 2010; Atoom AM *et al.*,

2013; Bentham MJ *et al.*, 2013). Il a été rapporté que p7 favorise le recrutement au site d'assemblage de protéines virales dont la protéine C, NS3 et NS5, et ce de façon indépendante de sa fonction de canal ionique et en association avec NS2 (Boson B *et al.*, 2011; Popescu CI *et al.*, 2011; Bentham MJ *et al.*, 2013; Vieyres G *et al.*, 2013). La délétion de p7 induit une perte d'infectiosité des particules virales intracellulaires, due à une diminution de l'incorporation de l'ARN viral dans la nucléocapside (Gentzsch J *et al.*, 2013). De plus, la protéine C en l'absence de p7 s'accumule à la surface des GLCs, suggérant que p7 recrute la protéine C à partir ces organelles afin de permettre leur localisation au site d'assemblage.

Toutes les interactions décrites de p7 avec les autres protéines virales ont été confirmées lors d'expériences de FRET (transfert d'énergie par résonance de fluorescence) (Figure 21) (Hagen N *et al.*, 2014). Ceci démontre que p7 n'est pas seulement une porine, mais une protéine virale en étroite liaison avec les autres protéines participant à l'assemblage viral. La protéine p7 interagissant avec les glycoprotéines d'enveloppe, il n'est pas exclu qu'elle puisse participer au recrutement des

Apos, et ainsi contribuer à la production de particules infectieuses. Aucune preuve évidente de cette association n'a cependant été supportée pour le moment.

II.2.C.e. NS2

En aval de la protéine p7 sur la polyprotéine se situe NS2, la première des protéines non-structurales. Protéine transmembranaire de 21 à 23 kDa, elle est ancrée dans la membrane du RE par son domaine N-terminal hydrophobe, constitué de 3 à 4 hélices alpha (Santolini E *et al.*, 1995). Le clivage de NS2 du côté C-terminal à la particularité

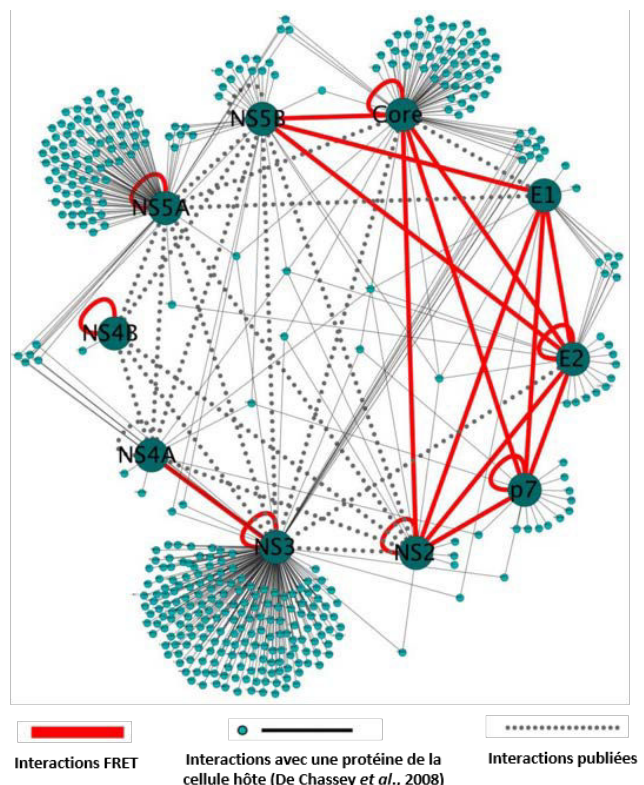


Figure 21 : Réseau d'interactions des protéines du VHC
d'après (Hagen N *et al.*, 2014)

d'être effectué par NS2 elle-même. En effet, son domaine C-terminal possède une activité cystéine protéase zinc-dépendante qui, en association avec l'extrémité N-terminale de NS3, permettra le clivage des deux protéines (Grakoui A *et al.*, 1993; Schregel V *et al.*, 2009). Une fois le clivage effectué, NS2 possède une demi-vie relativement courte et sera dégradée par le protéasome (Franck N *et al.*, 2005). NS2 peut également interagir directement avec la protéine de fusion CIDEB, inhibant alors le processus d'apoptose gouverné par CIDEB au niveau des mitochondries (Erdtmann L *et al.*, 2003). Cette étude a également démontré que l'apoptose induite par CIDEB implique la libération du cytochrome C dans le cytoplasme, et que NS2 prévient cette libération par sa fixation à CIDEB. Sa fonction de protéase mise à part, NS2 est également impliquée dans la morphogénèse virale de par son interaction avec les protéines structurales du virus (**Figure 21**) (Jones CT *et al.*, 2007; Yi M *et al.*, 2009; Jirasko V *et al.*, 2010; Popescu CI *et al.*, 2011). Bien que p7 soit capable de recruter la protéine C au RE de façon autonome, il est décrit que le domaine transmembranaire de NS2 est crucial dans la production de particules virales infectieuses, en permettant de façon concertée avec p7 la colocalisation entre la protéine C et E2, conduisant à l'initiation de l'assemblage viral (Boson B *et al.*, 2011).

II.2.C.f. NS3 / NS4A

NS3 et NS4A sont des protéines respectivement de 70 et 8 kDa. NS3 possède deux fonctions enzymatiques. La première, portée par sa partie N-terminale, est une activité sérine protéase responsable du clivage des protéines non-structurales en aval de NS3 (Hijikata M *et al.*, 1993a; Bartenschlager R *et al.*, 1995). La seconde est portée par le reste de la protéine et possède une activité hélicase / NTPase qui est cruciale pour la traduction et la réplication du génome viral (Suzich JA *et al.*, 1993; Kim DW *et al.*, 1995; Tai CL *et al.*, 1996; Lam AM and Frick DN, 2006). Elle permet à la fois de décompacter les dimères d'ARNs formés lors de la réplication virale, mais aussi de les séparer une fois la réplication achevée (Serebrov V and Pyle AM, 2004).

L'activité protéasique de NS3 permet d'autre part le clivage des protéines cellulaires TRIF (« TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β ») et MAVS (« mitochondrial antiviral-signaling protein »), impliquées dans la réponse immunitaire innée. Ces deux protéines sont capables de reconnaître l'ARN double brin et induisent la production d'interféron

endogène par les voies de signalisation RIG-1 et TLR-3. L'activité de NS3 permet donc un échappement viral à l'immunité naturelle, contribuant à la chronicité de l'infection virale (Gale M, Jr. and Foy EM, 2005). Le développement du Boceprevir et du Telaprevir visait à abolir cette fonction particulière de NS3, afin de procurer une réponse anti-virale prolongée chez les patients infecté par le VHC et donc une éradication virale (I.6.B).

Les protéines NS3 et NS4A agissent en complexe, NS4A représentant un co-facteur indispensable aux fonctions de NS3. En effet, même si NS3 peut se fixer sur l'ARN viral de façon indépendante, sa liaison à NS4A est indispensable à son activité hélicase (Pang PS *et al.*, 2002; Serebrov V and Pyle AM, 2004), mais aussi à son activité sérine protéase (Failla C *et al.*, 1994). Grâce à son domaine N-terminal hydrophobe ancré dans la membrane du RE, NS4A procure à NS3 un adressage au RE ainsi qu'une stabilisation de son domaine protéasique (Wolk B *et al.*, 2000).

II.2.C.g. NS4B

NS4B est une protéine très hydrophobe de 27 kDa, ancrée dans la membrane du RE par quatre domaines transmembranaires initiaux (Hugle T *et al.*, 2001; Lundin M *et al.*, 2003). Un cinquième domaine transmembranaire apparaît lors de modifications post-traductionnelles, transloquant dans le RE l'extrémité N-terminale constituée de 2 hélices α amphipathiques (Lundin M *et al.*, 2003). L'oligomérisation de la seconde hélice α , constituant donc le cinquième domaine transmembranaire, joue un rôle majeur dans le réarrangement de membranes dérivées du RE, aboutissant à la formation du « membranous web » (MW) (Egger D *et al.*, 2002; Gosert R *et al.*, 2003; Gouttenoire J *et al.*, 2010). Ce compartiment atypique constitue le principal lieu de réplication du génome viral.

NS4B interagit aussi bien avec des protéines cellulaires que virales de façon dépendante de sa palmitoylation, et possède des activités adénylate kinase et GDPase (Yu GY *et al.*, 2006; Thompson AA *et al.*, 2009). NS4B est impliquée dans la réplication de l'ARN viral *via* son site de liaison au GTP, ainsi que sa capacité à hyper-phosphoryler NS5A (Einav S *et al.*, 2004; Jones DM *et al.*, 2009). Cette dernière étude a également révélé un rôle potentiel de NS4B dans les étapes tardives du cycle viral, des mutations de la protéine entraînant une augmentation de la production de particules virales sans affecter l'étape de réplication.

Enfin, NS4B serait impliquée dans la régulation de la réponse UPR (« unfolded protein response ») du RE, diminuant la mortalité cellulaire induite par l'infection virale et ses altérations (Zheng Y *et al.*, 2005; Li S *et al.*, 2009). De façon intéressante, il est à noter qu'ERAD, la voie de dégradation de l'ApoB dans le RE (*cf.* Chapitre 1 : III.2 & **Figure 9**), est une des voies de l'UPR. NS4B pourrait ainsi favoriser la dégradation de l'ApoB, et expliquer en partie l'hypobétalipoprotéïnémie observée chez les patients infectés par le VHC (Negro F, 2010).

II.2.C.h. NS5A

La protéine NS5A est composée de 3 domaines et existe sous 2 formes, l'une, non phosphorylée, ayant une taille apparente de 56 kDa, et l'autre, hyper-phosphorylée, apparaissant à 58 kDa (Kaneko T *et al.*, 1994; Lindenbach BD *et al.*, 2007). Cette protéine est ancrée à la membrane du RE par ses deux hélices situées aux extrémités N- et C-terminales, qui s'enchâssent dans le feuillet externe de la membrane. Ses 3 domaines sont tous cruciaux dans la réplication de l'ARN viral, le domaine D1 contribuant à cette étape par son site de fixation au zinc qui s'est révélé indispensable (Tellinghuisen TL *et al.*, 2004; Tellinghuisen TL *et al.*, 2005). En effet, ce domaine serait responsable de l'homodimérisation de NS5A, formant ainsi un sillon permettant la fixation de l'ARN viral. La mutation de certains résidus du domaine D2 et D3 a démontré que ces deux domaines sont également importants dans la réplication virale (Tellinghuisen TL *et al.*, 2008b). De plus, le domaine D3 a la capacité d'interagir avec la protéine C, impliquant NS5A dans l'assemblage et la production de virus infectieux (Appel N *et al.*, 2008; Masaki T *et al.*, 2008).

Le degré de phosphorylation de la protéine NS5A semble jouer le rôle de balance entre ses fonctions dans la réplication et dans la morphogenèse virale. En effet, l'hyper-phosphorylation de la protéine diminue l'activité de réplication virale, mais augmente la production de particules virales infectieuses (Appel N *et al.*, 2005; Masaki T *et al.*, 2008; Tellinghuisen TL *et al.*, 2008a; Masaki T *et al.*, 2014). L'intervention de NS5A dans les étapes du cycle viral serait donc modulée par son état de phosphorylation.

L'hélice α en position N-terminale n'est pas seulement responsable de l'ancrage de NS5A dans la membrane du RE (Brass V *et al.*, 2002). Elle permet également la fixation de la protéine aux GLCs (Miyinari Y *et al.*, 2007), ainsi qu'au niveau du complexe de réplication

associé au MW où elle est impliquée dans la réplication (Elazar M *et al.*, 2003; Penin F *et al.*, 2004; Miyanari Y *et al.*, 2007). Le domaine D1 est organisé en dimère dont la conformation semble varier (Tellinghuisen TL *et al.*, 2005; Love RA *et al.*, 2009). Au même titre que la phosphorylation de la protéine, ces modifications de conformation du dimère modèleraient les rôles de NS5A entre la réplication et l'assemblage viral (Moradpour D and Penin F, 2013). D2 et D3 sont initialement organisés en monomères non repliés mais peuvent également subir une réorganisation en hélice α et ainsi interagir avec des protéines dont la cyclophiline A (Hanouille X *et al.*, 2009a; Hanouille X *et al.*, 2009b; Verdegem D *et al.*, 2011). De façon intéressante, Rab18, située à la surface des GLCs, a récemment été rapportée interagir de façon forte avec NS5A, favorisant ainsi le recrutement des GLCs aux sites de réplication du VHC (Salloum S *et al.*, 2013).

II.2.C.i. NS5B

NS5B est la dernière protéine synthétisée par le VHC. D'une taille apparente de 68 kDa, elle constitue l'ARN polymérase ARN dépendante et possède un motif glycine-acide aspartique-acide aspartique qui est caractéristique de cette famille de polymérases (Grakoui A *et al.*, 1993; Behrens SE *et al.*, 1996). Elle est composée de deux domaines. Le premier, côté N-terminal, est situé dans le cytoplasme et représente la quasi-totalité de la protéine. Le domaine C-terminal, lui, est un domaine transmembranaire permettant l'ancrage de la protéine au RE, et est indispensable à la réplication virale *in vivo* (Bressanelli S *et al.*, 1999; Schmidt-Mende J *et al.*, 2001; Moradpour D *et al.*, 2004a).

Cette polymérase présente une structure conventionnelle de type « main droite » : le pouce et les doigts forment un tunnel permettant le positionnement du brin matrice d'ARN, tandis que la paume possède l'activité de synthèse du nouveau brin (Bressanelli S *et al.*, 1999). NS5B ne possède pas d'activité correctrice ou « proof reading », expliquant la fréquence élevée de mutations dans le génome du VHC, les quasi-espèces résidant au sein d'un même patient infecté et ses conséquences pour l'échappement viral au système immunitaire et aux antiviraux (*cf.* I.4) (Stumpf MP and Pybus OG, 2002). La polymérase n'échappe pas à ces mutations. Leur étude a révélé différentes conformations spatiales du site enzymatique, modifications qui peuvent induire une structure plus fermée du site et corrèlent avec une réplication plus soutenue (Simister P *et al.*, 2009; Schmitt M *et al.*, 2011).

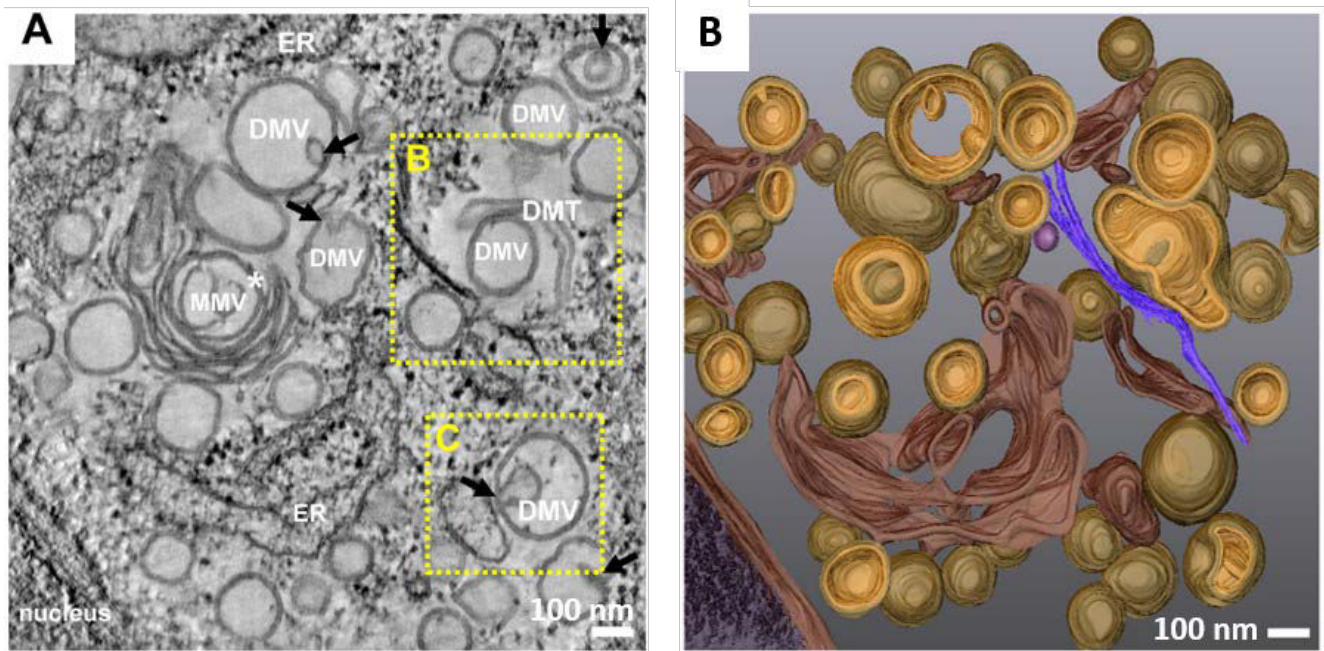
NS5B n'assure pas la réplication de l'ARN viral seule, mais de façon concertée en interagissant avec d'autres protéines virales (protéine C, NS3, NS4A, NS5A) (Lohmann V, 2013) et aussi cellulaires dont : PRK2 (« protein kinase C-related kinase 2 »), qui phosphoryle NS5B et augmente la réplication virale (Kim SJ *et al.*, 2004), les cyclophilines, qui favorisent les liaisons entre NS5B et l'ARN viral (Watashi K *et al.*, 2005; Kaul A *et al.*, 2009), mais aussi l'actine α (Lan S *et al.*, 2003), la nucléoline (Hirano M *et al.*, 2003), hVAPs (Gao L *et al.*, 2004; Hamamoto I *et al.*, 2005), et l'ubiquitine (Gao L *et al.*, 2003).

II.2.D. Réplication du génome viral

La classification de Baltimore inclut le VHC dans le groupe IV, groupe dans lequel l'ARN viral sert à la fois de support à la traduction et à la synthèse de brins complémentaires d'ARN de polarité négative. Ces brins négatifs servent d'intermédiaires afin de synthétiser les nouveaux brins d'ARN de polarité positive. Ces derniers pourront alors participer à l'amplification de la réplication virale en participant à un nouveau cycle et/ou être incorporés dans la capsidie des virions en cours de morphogénèse. La synthèse des brins positifs comme négatifs est effectuée par la même enzyme, NS5B (Moradpour D *et al.*, 2004a). Les protéines NS3/NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, ainsi que les extrémités 5' et 3' NCR sont nécessaires et suffisantes pour effectuer la réplication virale (Lohmann V *et al.*, 1999; Pietschmann T *et al.*, 2001). La réplication est asymétrique, la synthèse des brins positifs étant 5 à 10 fois supérieure à celle des brins négatifs.

II.2.D.a. Le « membranous web »

La réplication du génome viral a lieu au niveau du MW. Ce compartiment induit par l'oligomérisation de la protéine NS4B est dérivé des membranes du RE et présente une localisation péri-nucléaire (**Figure 22**) (Gosert R *et al.*, 2003; Moradpour D *et al.*, 2004a). L'absence de ribosome dans le MW exclut une traduction du génome viral à cet endroit, ne l'impliquant que dans la réplication virale, bien que son rôle exact durant cette étape ne soit pas totalement compris (Popescu CI *et al.*, 2014). Il pourrait fournir un échappement viral à la réponse immunitaire cellulaire contre les ARNs double-brin. Le MW a été décrit initialement comme un réarrangement membranaire du RE, aboutissant à la formation de vésicules compactes s'associant en un réseau (Egger D *et al.*, 2002).



DMV : Vésicule à double membrane ; Nucleus : noyau ; ER : Réticulum endoplasmique ;
DMT : tubule à double membrane ; MMV : vésicules multi-membranaires

Figure 22 : Visualisation du « Membranous web » par microscopie électronique

(A) MW dans des cellules Huh-7.5, 36 h post-infection par le VHC ;
(B) Reconstitution 3D du tomogramme. D'après (Romero-Brey I *et al.*, 2012)

Les travaux de Ferraris *et al.* ont ensuite démontré que le réarrangement membranaire pouvait conduire uniquement à la formation de vésicules sans qu'elles ne se regroupent obligatoirement (Ferraris P *et al.*, 2013). Ces vésicules ont été caractérisées par microscopie électronique démontrant qu'elles étaient délimitées par une double membrane (Ferraris P *et al.*, 2010; Romero-Brey I *et al.*, 2012; Ferraris P *et al.*, 2013), et associées aux GLCs (Ferraris P *et al.*, 2013). NS5A est l'acteur majeur dans la génération de cette double membrane vésiculaire (Romero-Brey I *et al.*, 2012). La purification de ces vésicules à double membrane (DMVs) et leur étude a confirmé la présence des différents acteurs de la réplication du VHC, avec cependant l'incapacité de certaines vésicules à permettre la synthèse d'ARN viral (Paul D *et al.*, 2013). En effet, les DMVs, dont la membrane interne se referme, isoleraient les complexes de réplication, les rendant inactifs que les DMVs soient encore associées ou non au RE (**Figure 23 A et B**) (Romero-Brey I *et al.*, 2012). Les complexes de réplication productifs seraient donc situés sur la membrane intérieure des DMVs non fermées ou sur la membrane extérieure (**Figure 23B et C**). Les vésicules hermétiques pourraient néanmoins devenir perméables *via* leur association avec des canaux protéiques (**Figure 23A**). Enfin, il n'est pas exclu que la

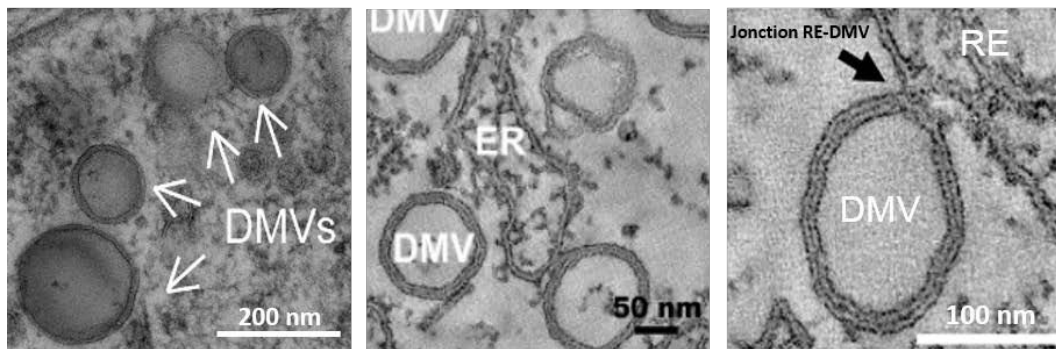
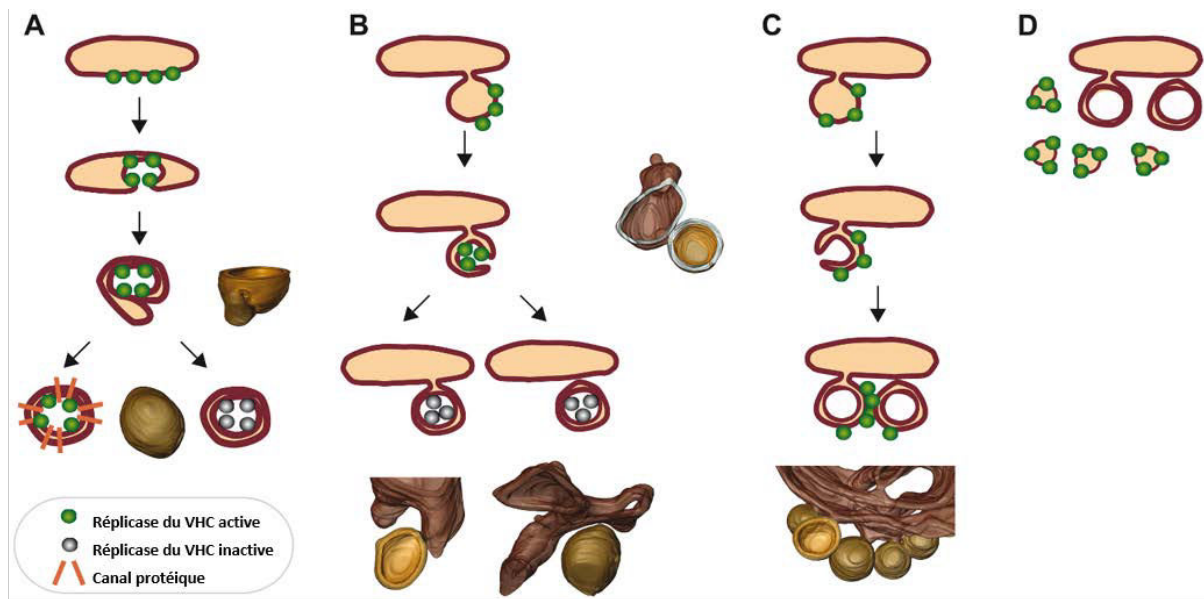


Figure 23 : Hypothèses sur la formation des DMVs et leur rôle dans la réplication du VHC

d'après (Romero-Brey I *et al.*, 2012; Romero-Brey I and Bartenschlager R, 2014)

réplication ne se déroule pas au niveau de ces compartiments, et que leur apparition ne soit qu'une simple conséquence de l'infection, sans implication dans le cycle viral (**Figure 23D**).

II.2.D.b. Autres acteurs cruciaux de la réplication virale : les lipides

Pas moins d'une trentaine de protéines cellulaires ont été impliquées dans la réplication du VHC, lors d'un ciblage par siRNA en cellules Huh-7 infectées (Randall G *et al.*, 2007). Nous avons vu que certaines protéines agissent directement avec la polymérase virale afin de favoriser la réplication (*cf.* II.2.C.i), mais d'autres agissent indirectement, notamment par des remaniements lipidiques. Le développement du MW implique une synthèse de membranes, donc un besoin en lipides incluant les PLs et le cholestérol, et par conséquent les AG. Il a été montré que la réplication du VHC nécessite la synthèse d'AG

par plusieurs enzymes, dont la FAS qui est surexprimée lors de l'infection par le VHC (Su AI *et al.*, 2002; Kapadia SB and Chisari FV, 2005; Yang W *et al.*, 2008; Rasmussen AL *et al.*, 2011; Naseri N *et al.*, 2013; Lyn RK *et al.*, 2014; Nguyen LN *et al.*, 2014). La phosphatidylinositol-4 kinase-III α (PI4KA) est activée et interagit avec NS5A *via* sa phosphorylation (PI4P) (Ahn J *et al.*, 2004; Berger KL *et al.*, 2011). Physiologiquement, PIAP sert d'intermédiaire à la production de phosphoinositides, des dérivés de phosphatidylinositols. Lors de l'infection par le VHC et grâce à sa liaison avec NS5A, PIAP recrute aux complexes de réplication deux protéines impliquées dans le transfert de lipides : OSBP (« oxysterol-binding protein ») et FAPP2 (« four-phosphate adaptator 2 ») (Khan I *et al.*, 2014; Wang H *et al.*, 2014).

OSBP est un transporteur non-vésiculaire, véhiculant le cholestérol du RE vers le Golgi, en interagissant respectivement avec hVAP-A (*cf.* II.2.C.i) et PIAP/Arf1 (*cf.* Chapitre 1 : III.2) qui ont tous été impliqués dans la réplication du génome viral (Gao L *et al.*, 2004; Matto M *et al.*, 2011; Zhang L *et al.*, 2012; Mesmin B *et al.*, 2013). OSBP serait donc détourné afin d'enrichir en cholestérol les membranes associées aux complexes de réplication (Wang H *et al.*, 2014). FAPP2 est un transporteur non-vésiculaire de glucosylcéramides qui sont des précurseurs des sphingolipides (D'Angelo G *et al.*, 2007). FAPP2 est également recruté aux complexes de réplication virale de façon dépendante de PIAP, où il délivre les glucosylcéramides et promeut ainsi la réplication (Khan I *et al.*, 2014). Ces mêmes auteurs ont également montré, lors d'expériences de « rescue » en cellules Huh-7.5 éteintes pour FAPP2, que l'ajout de lactosylceramide ou de globotriaosylceramide (deux types des sphingolipides synthétisés à partir de glucosylcéramide) suffit à rétablir le niveau de réplication virale. PLA2, qui facilite la courbure des membranes (Chapitre 1 : II.1.B), a également été incriminée dans cette étape du cycle viral (Xu S *et al.*, 2012), probablement en favorisant la formation des DMVs. Cette hypothèse est confortée par l'action de la PSTPIP2 (« proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 ») qui permet une modification de la conformation des protéines, et a également été impliquée dans cette étape virale (Chao TC *et al.*, 2012). D'autres protéines impliquées dans le métabolisme lipidique ont également été rapportées favoriser la réplication du virus, dont le FXR (« farnesoid X receptor »), intervenant dans le métabolisme de la bile à partir du cholestérol (Scholtes C *et al.*, 2008), ainsi que les synthétases de sphingomyéline 1 et 2, qui sont surexprimées lors de l'infection par le VHC (Hirata Y *et al.*, 2012). PLIN3, protéine

associée aux GLCs, joue également un rôle crucial dans cette étape virale. Son niveau d'expression corrèle avec le niveau de réplication de génome viral, allant jusqu'à une abolition de la réplication lors de l'extinction totale de PLIN3 dans les cellules infectées (Ploen D *et al.*, 2013a).

Enfin, il a été prouvé que le VHC peut détourner à son avantage un micro ARN interférant (miRNA), miR-122, spécifiquement exprimé dans les hépatocytes et impliqué dans le métabolisme lipidique des AG et du cholestérol (Jopling CL *et al.*, 2005; Esau C *et al.*, 2006). Les miRNAs sont des ARNs non codants dont la fonction est d'inhiber l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel, et sont considérés comme un système de défense des cellules contre les virus (Ambros V, 2004). Cependant, miR-122 apparaît comme un composant crucial dans la réplication du VHC. En effet, sa fixation à l'extrémité 5'NCR du génome a pour conséquence d'amplifier la synthèse d'ARN viral et d'éviter sa dégradation par des exonucléases (Jopling CL *et al.*, 2005). Il a également été décrit que miR-122 est l'un des éléments essentiels pour que des cellules non-hépatiques et initialement non-permissives au VHC, en l'occurrence des Hek-293T, puissent réaliser le cycle infectieux complet du VHC, les autres facteurs nécessaires étant l'OCLN, la CLDN1, CD81, SR-B1 et l'ApoE (Da Costa D *et al.*, 2012). En contexte non-infectieux chez la souris, il a été rapporté que l'inhibition de miRNA-122 induit une stéatose et des tumeurs hépatiques, dues au développement d'une inflammation et l'induction de facteurs oncogéniques (Hsu SH *et al.*, 2012; Tsai WC *et al.*, 2012). L'expression de miR-122 jouerait donc un rôle dans la persistance du VHC, en prévenant les pathologies survenant au cours de l'infection chronique.

A l'inverse, certains types de lipides peuvent inhiber la réplication virale. C'est le cas des AG poly-insaturés qui, lors de leur accumulation, induisent leur peroxydation et une diminution du cholestérol intracellulaire (Kapadia SB and Chisari FV, 2005; Huang H *et al.*, 2007a). Cette diminution de disponibilité du cholestérol a été décrite comme délétère pour la réplication virale (Pollock S *et al.*, 2010; Yamane D *et al.*, 2014), cette étape ayant lieu dans des domaines membranaires riches en cholestérol (Shi ST *et al.*, 2003; Aizaki H *et al.*, 2004). Yamane et collaborateurs ont également observé que, parmi 4 génotypes testés, seule la souche JFH1 de génotype 2a du VHC était insensible à la peroxydation des AG polyinsaturés, à rapprocher du fait que JFH1 est l'une des souches qui possèdent le plus fort pouvoir répliatif en lignée cellulaire.

CIDEB, qui participe à l'apoptose et à la fusion des GLCs (*cf.* Chapitre 1 : II.1.D.a), a récemment été impliquée dans l'inhibition de la réplication virale lors de sa surexpression (Singaravelu R *et al.*, 2014b). Cette inhibition est indépendante de la fonction de CIDEB dans la fusion des GLCs, puisqu'un mutant de CIDEB défectueux dans la fusion des GLCs permet tout autant l'inhibition de la réplication. L'effet antiviral de CIDEB semble paradoxal de prime abord car les cellules infectées par le VHC présentent une augmentation d'expression de CIDEB, induite par l'activation de PGC-1 α («peroxisome-proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α ») (Shlomai A *et al.*, 2012; Singaravelu R *et al.*, 2014b). Cependant, l'expression de CIDEB, lorsqu'elle est gouvernée par PGC-1 α , stimule la biogenèse des VLDLs en favorisant la lipidation de l'ApoB en cours de synthèse (Ye J *et al.*, 2009; Chen Z *et al.*, 2010). Bien que CIDEB inhibe la réplication virale, sa surexpression conférerait donc un avantage supérieur au VHC en favorisant sa morphogénèse par un détournement des lipides cellulaires.

II.2.E. Assemblage des particules virales

Avant-dernière étape avant la sécrétion des particules virales, l'assemblage va permettre le recrutement du génome viral et des protéines structurales du virus afin de former les virions (**Figure 24**). Il s'agit également de l'étape la moins comprise du cycle avec l'étape de sécrétion, et ceci dû au développement tardif de modèles permettant la production de particules virales infectieuses. L'assemblage peut se diviser en deux parties, une précoce et une tardive. L'étape précoce constitue la phase de recrutement des constituants viraux en un même lieu d'assemblage, tandis que l'étape tardive correspond au bourgeonnement de la particule virale où elle acquiert sa structure.

Bien que le lieu de bourgeonnement n'ait pas été observé en microscopie électronique, il est considéré que le bourgeonnement du VHC a lieu à la membrane du RE, vers sa lumière. Ceci est étayé par la topologie des glycoprotéines d'enveloppe du VHC qui sont ancrées à la membrane du RE, ainsi que la visualisation de pseudo-particules (Baumert TF *et al.*, 1998; Blanchard E *et al.*, 2002; Acosta-Rivero N *et al.*, 2003; Roingeard P *et al.*, 2008). Cependant la première étape de l'assemblage consiste à recruter et/ou séquestrer les GLCs par la protéine C. En effet, il a été proposé que les GLCs associées à la protéine C mature constituent la plate-forme d'assemblage des virions (Miyanari Y *et al.*, 2007). En fait, si la localisation de la protéine C aux GLCs est indispensable à l'assemblage et à la

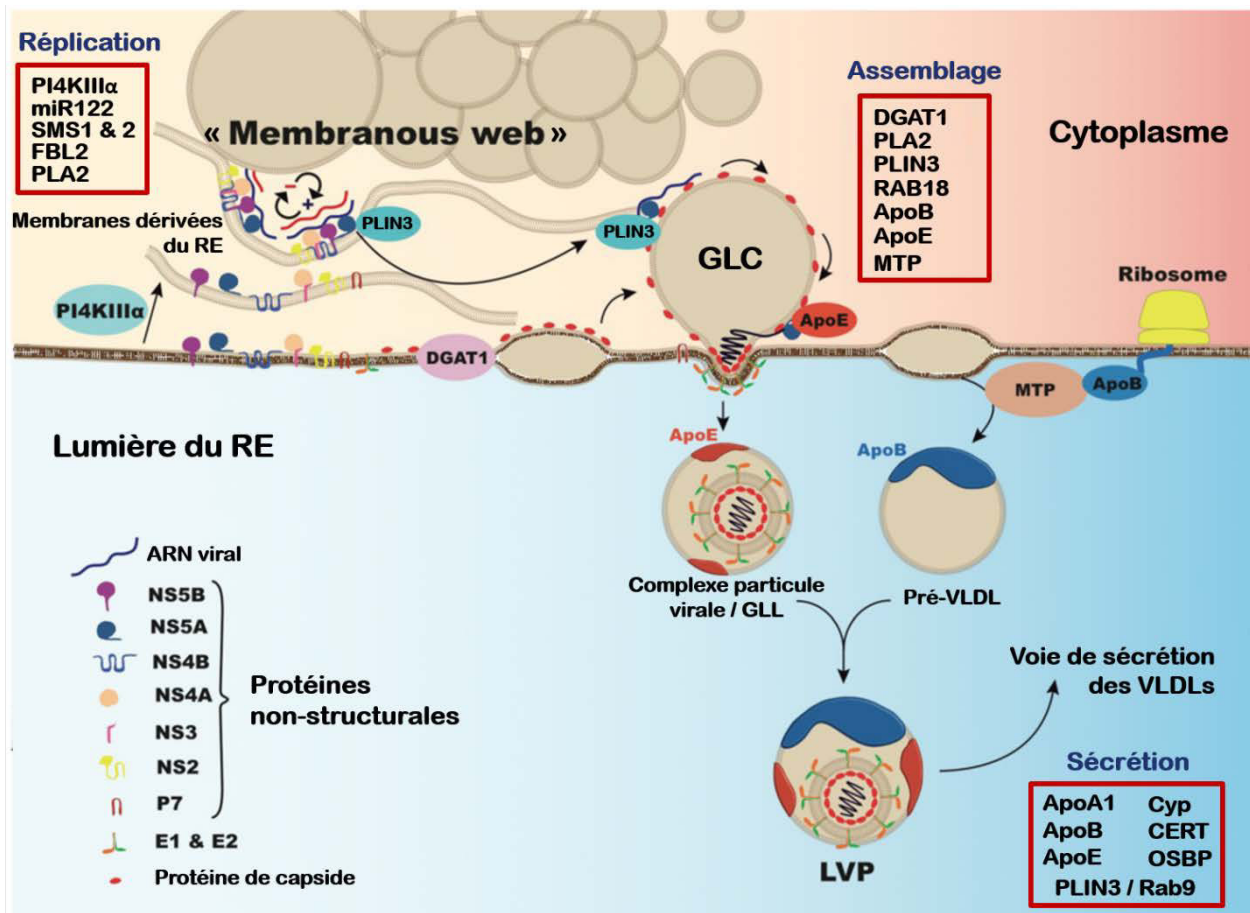


Figure 24 : Réplication et morphogénèse virale
(Felmlee DJ *et al.*, 2013)

production de particules virales infectieuses (Shavinskaya A *et al.*, 2007; Boulant S *et al.*, 2008; Targett-Adams P *et al.*, 2008; Boson B *et al.*, 2011), il en est autant pour sa localisation au RE avec les glycoprotéines d'enveloppe, probablement pour réaliser le bourgeonnement. PLA2 est également un acteur de la localisation de la protéine C aux GLCs (Menzel N *et al.*, 2012).

II.2.E.a. Etapes précoces de l'assemblage viral

Nous avons vu que le destin des GLCs est régulé par le protéome qui leur est associé (*cf.* Chapitre 1 : II.1.C) (Bartz R *et al.*, 2007; Welte MA, 2007). A ce titre, la localisation des GLCs est régulée en majeure partie par les PLINs, dont notamment PLIN2 qui est la plus exprimée à la surface des GLCs et responsable de la séquestration des GLCs dans le cytoplasme (Marcinkiewicz A *et al.*, 2006). Or en contexte infectieux, DGAT1, qui enrichit en TAGs les GLCs en cours de synthèse, permet également la localisation de la protéine C mature (*via* son domaine D2) à leur surface (Herker E *et al.*, 2010). Cet enrobage des GLCs

par la protéine C a pour conséquence de remplacer PLIN2 en faveur d'un enrichissement en PLIN3, et donc de favoriser la rétention des GLCs à la membrane du RE (Boulant S *et al.*, 2006; Boulant S *et al.*, 2008). De façon concomitante, Rab18 permet également le recrutement de la protéine C aux GLCs, en plus de sa capacité intrinsèque à retenir les GLCs au RE (Ozeki S *et al.*, 2005; Dansako H *et al.*, 2014). L'extrémité 3'NCR facilite l'assemblage viral en recrutant DDX3 (« DEAD Box polypeptide 3 »), qui induira la lipogenèse et la formation de GLCs via l'activation de SREBP-1 (Li Q *et al.*, 2013). Lors de l'infection par le VHC, DDX3 est également localisée au niveau des GLCs, où elle co-localise avec les protéines du complexe de réplication (Pene V *et al.*, 2015).

La protéine C aux GLCs permet ensuite le recrutement de NS5A (Masaki T *et al.*, 2008; Masaki T *et al.*, 2014), tout comme DGAT1 (Camus G *et al.*, 2013). Grâce à son domaine D1 liant l'ARN viral génomique, la protéine C pourrait également être responsable de la séquestration du génome viral au site d'oligomérisation de la capsid (Boulant S *et al.*, 2005). Le domaine D1 de NS5A, quant à lui, possède un rôle important *via* son association aux GLCs et à l'ARN viral, mais aussi par son domaine D3 qui se lie à la protéine C (*cf.* II.2.C.h) (Appel N *et al.*, 2008).

Il a été décrit récemment que PLIN3, non lié aux GLCs, s'associe avec NS5A (Ploen D *et al.*, 2013a). De par l'enrichissement des GLCs en PLIN3 et la propriété du domaine D3 de NS5A à interagir avec la protéine C, il est supposé que le couple NS5A/PLIN3 est responsable de la migration de l'ARN viral du MW vers les GLCs riches en protéine C (**Figure 24**) (Felmlee DJ *et al.*, 2013). Dernière protéine cruciale dans la relocalisation de NS5A aux GLCs, l'ApoE recrute cette dernière grâce à son hélice α en position C-terminale, une fonction importante à la fois pour l'assemblage mais aussi pour la production de particules virales infectieuses (Benga WJ *et al.*, 2010; Cun W *et al.*, 2010). De façon additionnelle, Rab18 permet également le recrutement de NS5A aux GLCs associées au RE, de façon directe (Salloum S *et al.*, 2013).

Afin de renforcer le recrutement de NS5A aux GLCs, DGAT1 intervient en formant un complexe avec NS5A et la protéine C, ainsi qu'en favorisant la liaison entre ces 2 protéines virales (Camus G *et al.*, 2013). ApoJ, une protéine chaperon exprimée physiologiquement au Golgi et retrouvée abondamment dans les VLDLs, stabilise également le complexe protéine C / NS5A. Lors de l'infection par le VHC, son expression est augmentée à la fois

dans les HHP et dans le sérum de patients chroniquement infectés, et est relocalisée à la surface des GLCs où elle co-localise avec la protéine C / NS5A et l'ARN viral (Lin CC *et al.*, 2014).

II.2.E.b. Etapes tardives de l'assemblage viral

L'étape tardive de l'assemblage est une des étapes les plus méconnues du cycle viral du VHC, tant sur sa localisation que sur les mécanismes et partenaires impliqués. Elle est supposée être initiée par l'oligomérisation de la protéine C lors de la formation de la capsid, ainsi que l'hétérodimérisation d'E1 et E2 *via* les ponts disulfures entre leur domaine transmembranaire (Vieyres G *et al.*, 2010). Ces deux processus sont présumés être des moteurs dans l'initiation du bourgeonnement, propulsant la membrane dans la lumière du RE (**Figure 24**). De plus, des travaux du laboratoire ont montré que le clivage de la protéine C immature par la SPP n'est pas primordial à l'initiation du bourgeonnement ; l'inhibition de ce clivage, qui maintient la protéine C à la membrane du RE, favoriserait au contraire le bourgeonnement (Vauloup-Fellous C *et al.*, 2006). La protéine C est recrutée au site d'assemblage par les couples p7/NS2 et NS3/NS4A (Jirasko V *et al.*, 2010; Boson B *et al.*, 2011; Ma Y *et al.*, 2011; Popescu CI *et al.*, 2011; Stapleford KA and Lindenbach BD, 2011). Simultanément, l'ARN virale synthétisé est acheminé au site d'assemblage. Son recrutement serait opéré par le couple NS3-4A, car leur mutation induit une diminution d'assemblage des particules virales (Beran RK *et al.*, 2009; Pietschmann T *et al.*, 2009; Phan T *et al.*, 2011).

Tout au long de la formation de la capsid, la protéine C s'associe avec le domaine N-terminal d'E1, tandis que le domaine D1 s'associe avec l'ARN viral dans la particule virale naissante (*cf.* II.2.C.a). Il est à noter que la liaison entre E1 et la protéine C nécessite au préalable l'oligomérisation de cette dernière, ainsi que sa liaison à l'ARN viral (Nakai K *et al.*, 2006). La protéine C co-localise également avec E2 au site d'assemblage des virions (Miyinari Y *et al.*, 2007). PLA2 favorise cette liaison protéine C / E2, et contribue donc à l'assemblage viral. En effet, l'association entre ces deux protéines structurales est 5 fois moins importante lors de l'extinction de PLA2, réduisant de 100 fois l'infectiosité des particules virales sécrétées (Menzel N *et al.*, 2012; Li X *et al.*, 2014). La protéine p7 intervient également de par son activité de viroporine en diminuant l'acidité des compartiments de la voie de sécrétion (Wozniak AL *et al.*, 2010), évitant ainsi une

modification de la conformation des glycoprotéines d'enveloppe (Jones CT *et al.*, 2007). Le bourgeonnement aboutit à la libération dans la lumière du RE de la particule virale, constituée alors de E1 / E2 qui sont enchâssées dans l'enveloppe, de la capsidie et du génome viral, mais peut-être aussi de protéines cellulaires comme les Apos. A ce jour, il n'est pas élucidé si leur association s'opère au moment bourgeonnement ou plus tard dans les voies de sécrétion de la cellule

II.2.F. Sécrétion des particules virales

II.2.F.a. Maturation

Bien que les particules virales soient hétérogènes dans le sang circulant des patients, les plus infectieuses sont celles associées aux VLDLs (Thomssen R *et al.*, 1992; Prince AM *et al.*, 1996; Andre P *et al.*, 2002; Nielsen SU *et al.*, 2006). Ces dernières étant synthétisées spécifiquement dans l'hépatocyte (*cf.* Chapitre 1 : III), il est supposé que leur association avec les particules virales s'effectue au sein de la cellule productrice. Cette hypothèse est soutenue par la baisse de production de virus infectieux observée lors de l'inhibition de la biogenèse des VLDLs, suggérant un lien intime entre la morphogénèse du VHC et la biogenèse des VLDLs. En effet, l'utilisation de la naringénine, flavonoïde du pamplemousse, ou de molécules pharmacologiques inhibant la MTP, réduisent la sécrétion de virus infectieux pour la plupart des auteurs (Huang H *et al.*, 2007b; Nahmias Y *et al.*, 2008), bien que cela soit controversé (Jiang J and Luo G, 2009). Cependant, la surexpression de la protéine C chez la souris bloque l'activité de transfert lipidique de la MTP, sans impacter son niveau d'expression (Perlemuter G *et al.*, 2002). Ces données contradictoires sur l'utilisation de la MTP par le VHC seraient expliquées par une intervention disjointe des deux processus. Dans un temps précoce, le virus utiliserait à ses fins l'activité de MTP afin de disséminer l'infection, puis dans un second temps, après avoir atteint un niveau d'infection élevé, la protéine C inhiberait la MTP afin de limiter la production virale (Mirandola S *et al.*, 2010; Hussain MM *et al.*, 2012). La MTP est donc une protéine clé dans la morphogénèse du VHC, constituant un pont entre ce processus et la biogenèse des VLDLs.

La caractérisation des particules virales intracellulaires révèle qu'elles sont associées aux ApoB (Huang H *et al.*, 2007b; Gastaminza P *et al.*, 2008; Nahmias Y *et al.*, 2008; Icard V *et*

al., 2009), ApoE (Chang KS *et al.*, 2007; Jiang J and Luo G, 2009; Owen DM *et al.*, 2009; Benga WJ *et al.*, 2010; Merz A *et al.*, 2011; Hueging K *et al.*, 2014) et ApoC1 (Meunier JC *et al.*, 2008), l'extinction de leur expression bloquant la production virale. ApoA1 est également impliquée à la fois dans l'étape de répllication et de morphogenèse virale (Mancone C *et al.*, 2011). Il existe néanmoins une controverse dans la littérature quant au rôle de l'ApoB dans la morphogenèse virale (Jiang J and Luo G, 2009; Cun W *et al.*, 2010).

Une étude récente montre cependant par immunofluorescence *in situ* que les particules virales naissantes s'associent précocement à l'ApoB et à l'ApoE au sein du RE (Boyer A *et al.*, 2014). L'immunocapture des complexes viraux intra et extracellulaires confirme qu'ils conservent cette association aux lipoprotéines après sécrétion du virus. Les mêmes auteurs prouvent également que l'utilisation d'Ac neutralisants dirigés spécifiquement soit contre ApoB, soit contre ApoE, diminuent l'infectiosité des particules sécrétées. Il reste que la majorité des études sont réalisées en lignée Huh-7, cellules déficientes pour la sécrétion VLDLs. En effet, contrairement aux cultures primaires d'hépatocytes, les Huh-7 sécrètent l'ApoB à la densité des LDLs (entre 1,06 et 1,10 g/ml) suggérant un défaut de maturation intracellulaire des lipoprotéines (Podevin P *et al.*, 2010; Meex SJ *et al.*, 2011).

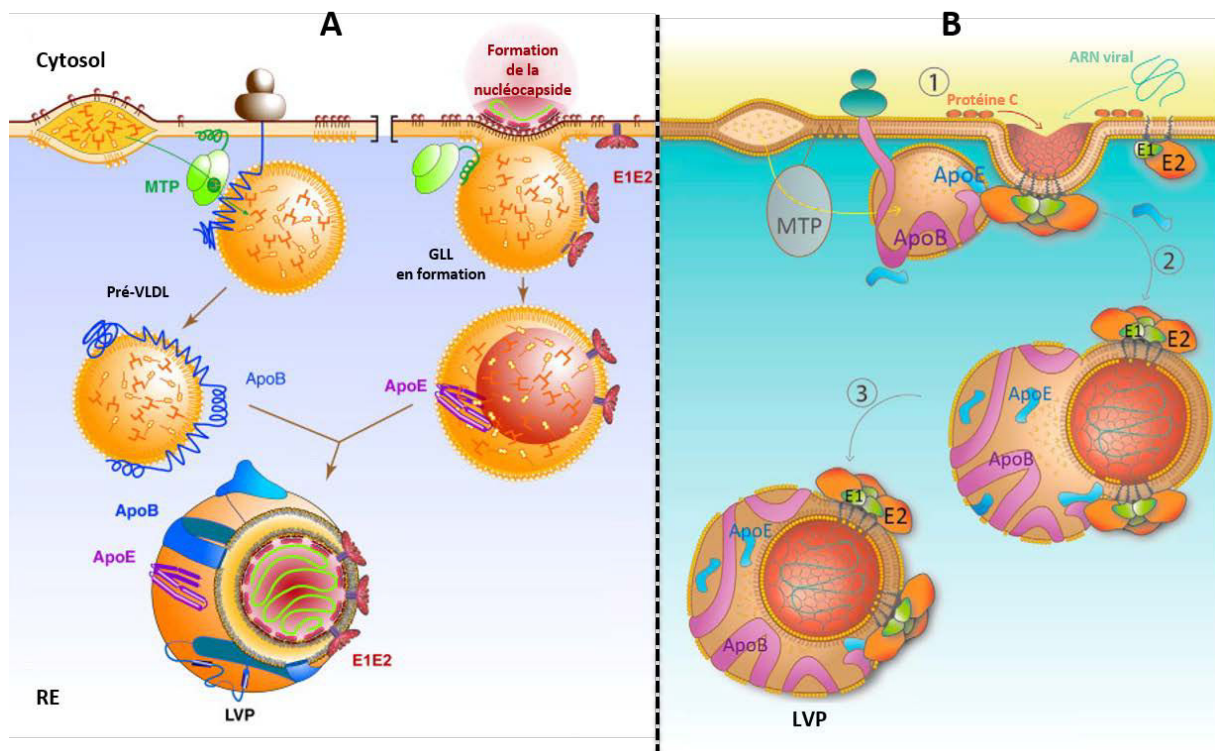


Figure 25 : Modèles de morphogenèse des lipo-viro-particules
d'après (Bartenschlager R *et al.*, 2011; Boyer A *et al.*, 2014)

Le processus d'association entre la particule virale et la / les lipoprotéine(s) demeure non élucidé, dû en partie aux incertitudes concernant la biogenèse des VLDLs. Plusieurs hypothèses sont émises : la première ferait intervenir le bourgeonnement viral directement au niveau d'une GLL naissante à laquelle sera associée une ApoE (**Figure 25 A**) (Bartenschlager R *et al.*, 2011). Le complexe virus/GLL/ApoE fusionnerait ensuite avec une pré-VLDL afin de l'enrichir en lipides, formant ainsi une LVP. A l'inverse, la seconde hypothèse associerait la particule virale en cours de bourgeonnement avec la pré-VLDL, possédant déjà l'ApoE (**Figure 25 B**) ou l'acquérant par la suite (Boyer A *et al.*, 2014). Dans de ces deux hypothèses, le bourgeonnement viral serait favorisé par la fixation de la particule virale à la GLL ou la pré-VLDL, lesquelles, « bourgeonnant » dans la lumière du RE entraîneraient avec elles la particule virale (Popescu CI *et al.*, 2014). Dans la troisième et dernière hypothèse, la particule virale bourgeonnerait de façon indépendante des lipoprotéines, puis une fois libérée pourrait s'associer aux GLL et pré-VLDL (**Figure 24**) (Felmlee DJ *et al.*, 2013; Popescu CI *et al.*, 2014).

II.2.F.b. Sécrétion

Il est admis que la particule virale suit la voie de sécrétion des VLDLs en passant par l'appareil de Golgi *via* une VTV (**Figure 10**). Une fois dans l'appareil de Golgi, la particule virale subit d'autres maturations, dont la modification des N-glycanes au niveau de E1 et E2 (Roth J, 2002). Les particules virales peuvent également s'enrichir en lipides au sein de ce compartiment, au même titre que les VLDLs, *via* le transfert de TAGs provenant d'une GLC (**Figure 10**). Une étude récente a démontré que les TAGs et esters de cholestérols contenus dans les GLCs sont importants dans la morphogénèse virale (Liefhebber JM *et al.*, 2014). L'inhibition de synthèse des TAGs ou des esters de cholestérol respectivement par la triacsin C, enzyme inhibant l'ACSL, ou l'YIC-C8-434, un inhibiteur de l'AcylCoA cholestérol acyltransférase, diminuait significativement l'infectiosité des particules virales sécrétées et de façon concomitante augmentait leur densité.

PLIN3 se fixe de façon originale aux particules virales, de par son affinité aux lipoprotéines, et est cruciale à la sécrétion du virus *via* sa liaison avec Rab9 (Ploen D *et al.*, 2013b). Rab9 est responsable du transport des vésicules vers le trans-Golgi, notamment par son interaction avec PLIN3. L'inhibition de cette interaction conduit la particule virale

à sa dégradation par un lysosome, démontrant l'importance du couple PLIN3/Rab9 (Ploen D *et al.*, 2013b).

La sécrétion des particules virales est dépendante de la synthèse des sphingolipides. En effet, l'inhibition de la phosphorylation de la OSBP diminue la réplication virale et abolit la sécrétion des virions (*cf.* II.2.D.b) (Amako Y *et al.*, 2009). OSBP, de par sa fonction de récepteur cytosolique au cholestérol oxydé, intervient dans l'homéostasie du cholestérol, le métabolisme des PLs et le transport vésiculaire (Yan D and Olkkonen VM, 2008). Sa participation dans la sécrétion du virus s'effectue en régulant le transfert des céramides, effectué par la protéine de transfert de céramides (CERT), dans l'appareil de Golgi (Amako Y *et al.*, 2009). Ainsi transférés dans le Golgi, les céramides permettent la synthèse *de novo* de sphingomyéline qui est nécessaire à la sécrétion des vésicules. La protéine kinase D phosphoryle OSBP et CERT, respectivement sur les sérines en position 132 et 240, inhibant leur fonction. De fait, la protéine kinase D tend à réduire la sécrétion des VLDLs, mais aussi du virus, comme cela est démontré lors de la surexpression de cette enzyme (Amako Y *et al.*, 2011). De façon intéressante, les mêmes auteurs démontrent que l'infection par le VHC diminue l'activation de la protéine kinase D, tournant ainsi la sécrétion des lipides à son avantage.

Un autre mécanisme de détournement de la voie de sécrétion des lipides est celui faisant intervenir le gène *PTEN* (« phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 »). Ce gène est associé à un rôle anti-tumoral et est sous-exprimé lors de cancers, dont le CHC (Leslie NR and Foti M, 2011), mais aussi lors des stéatoses hépatiques non-alcooliques, induites par le VHC ou non (Vinciguerra M *et al.*, 2008; Clement S *et al.*, 2011). L'extinction de *PTEN* en lignée Huh-7 stimule la sécrétion des particules du VHC, tandis que sa surexpression inhibe cette sécrétion (Peyrou M *et al.*, 2013). L'extinction de *PTEN* engendre également une augmentation de la biosynthèse d'esters de cholestérol, provoquant par leur stockage une augmentation de la taille des GLCs. L'augmentation des esters de cholestérol dans les GLCs peut servir ensuite à enrichir les LVPs ou les vésicules de sécrétion (**Figure 10**), favorisant ainsi la sécrétion de par sa propriété à fluidifier les membranes (Pollard TD *et al.*, 2004). Il est à noter que les patients infectés par le VHC présentent fréquemment une hypocholestérolémie, corrélant avec les précédentes observations (Hofer H *et al.*, 2002; Honda A and Matsuzaki Y, 2011). Les protéines de la famille des cyclophilines, au-delà de leur rôle dans la réplication virale (Watashi K *et al.*,

2005; Gaither LA *et al.*, 2010), participent à la voie de sécrétion des lipides. Par conséquent, elles participent également à celle des particules virales comme cela est démontré lors de l'inhibition des cyclophilines (Anderson LJ *et al.*, 2011). Leur inhibition induit une fusion des GLCs, une accumulation de l'ApoB sous forme d' « ApoB-crescents » responsable de sa séquestration / dégradation et d'une diminution de sécrétion des VLDLs. Ces résultats apportent un argument supplémentaire en faveur de l'utilisation de la voie de sécrétion des VLDLs par le virus, à ses fins. Les LVPs incorporent de nouveau une VTV afin d'être sécrétées dans le milieu extracellulaire par les mécanismes usuels de sécrétion cellulaire, dépendant notamment des microtubules et de VAMP1 (Coller KE *et al.*, 2012).

II.3. Les modèles d'infection

II.3.A. Les modèles d'infection *in vivo*

II.3.A.a. Modèles primates

Naturellement, le VHC n'est retrouvé que chez l'espèce humaine, chimpanzé peut être infecté expérimentalement par des particules VHCser ou VHCcc de plusieurs génotypes, et le cycle infectieux complet a lieu, y compris la production de virus infectieux (Alter HJ *et al.*, 1978; Hollinger FB *et al.*, 1978; Lindenbach BD *et al.*, 2006; Kato T *et al.*, 2008). Le chimpanzé est pertinent dans l'étude du VHC car l'infection par le VHC est stable (Erickson AL *et al.*, 1993; Walker CM, 1997; Beard MR *et al.*, 1999). Contrairement aux modèles d'animaux « humanisés », le chimpanzé est immunocompétent, et induit d'ailleurs une réponse immunitaire similaire à celle développée chez l'Homme. Toutefois, les chimpanzés ne développent ni fibrose, ni cirrhose, et présentent des lésions hépatiques moins importantes que chez l'Homme. Bien qu'il ait contribué à l'identification du VHC et l'étude de la phase aiguë de l'infection, le recours à ce modèle est de moins en moins justifié tant sur le plan éthique que financier (Beames B *et al.*, 2000).

II.3.A.b. Modèles murins

Les modèles murins ont été développés afin de remplacer le modèle simien. Le premier d'entre eux est développé à partir de souris uPA/SCID (« albumin-urokinase-type plasminogen activator / severe combined immunodeficiency ») (Mercer DF *et al.*, 2001).

Ces souris ont un système immunitaire aboli et leurs hépatocytes sont spécifiquement détruits par la production d'urokinase plasminogène induite par un transgène. Au cours de leur destruction, des hépatocytes humains xénotransplantés peuvent recoloniser le foie des souris (Meuleman P and Leroux-Roels G, 2008). Le foie chimérique ainsi développé est permissif au VHC, conférant une infection virale prolongée avec la détection de titres infectieux, mais sans développer de réponse immunitaire (Mercer DF *et al.*, 2001; Meuleman P *et al.*, 2005; Meuleman P and Leroux-Roels G, 2008). Jusqu'à présent, l'étude du système immunitaire ne pouvait se faire que chez les chimpanzés ou bien chez l'Homme, le système immunitaire des souris étant aboli afin que la xénotransplantation ne soit pas rejetée par l'organisme receveur. Très récemment, un nouveau modèle de souris humanisées HIS-HUHEP, pour « human immune system – human hepatocytes », a justement été développé afin de permettre l'étude du système immunitaire humain chez la souris (Strick-Marchand H *et al.*, 2015).

Un nouveau modèle original, variant du précédent modèle princeps, utilise pour recoloniser le foie des souris des hépatocytes humains générés à partir de cellules souches pluripotentes induites (Carpentier A *et al.*, 2014). Des cellules somatiques sanguines ou des fibroblastes dermiques prélevés de patients peuvent ainsi être différenciées en hépatocytes, après reprogrammation nucléaire. Ce système présente deux avantages majeurs : *primo*, ces cellules humaines sont beaucoup plus faciles d'accès par rapport aux hépatocytes humains et, *secondo*, possèdent *de facto* le patrimoine génétique du patient. Ce dernier point permet à la fois l'étude de l'impact du fond génétique du patient sur l'infection, mais également de développer des traitements sur mesure.

II.3.B. Les modèles cellulaires

II.3.B.a. L'évolution des modèles jusqu'en 2005

Les tentatives de culture du VHC remontent avant même la découverte de son génome en 1989, mais restèrent infructueuses. Ce virus est le premier de l'histoire de la virologie à avoir été identifié d'abord par clonage de son génome, avant d'avoir été visualisé et cultivé. Le système d'expression hétérologue d'E1 et E2, de façon stable ou transitoire, bien que limité à l'étape de fixation du virus, a permis l'identification des récepteurs

membranaires CD81 et SR-B1 (Pileri P *et al.*, 1998; Scarselli E *et al.*, 2002), ainsi que l'étude de la structure et des propriétés d'E1 et E2 (Dubuisson J *et al.*, 1994; Dubuisson J *et al.*, 2000; Patel AH *et al.*, 2000). En 2003 a été décrit le système des VHCpp, qui sont des chimères entre des particules lentivirales ou rétrovirales et les glycoprotéines d'enveloppe du VHC qui sont enchâssées dans l'enveloppe de ces pseudotypes viraux (Bartosch B *et al.*, 2003b; Drummer HE *et al.*, 2003; Hsu M *et al.*, 2003). Les VHCpp sont utilisées afin d'étudier l'entrée virale exclusivement et ont contribué à l'identification des autres récepteurs d'entrée du VHC.

Une des grandes étapes dans l'avancée des recherches sur le VHC fut la mise au point de réplicons, qui ont permis de défricher les mécanismes de réplication et de traduction virale (Lohmann V *et al.*, 1999). Il s'agit d'un ADNc comprenant tout ou partie du génome du VHC, et doué d'auto-réplication lors de sa transfection en cellules de lignée hépatocytaire (Ikeda M *et al.*, 2002; Pietschmann T *et al.*, 2002). Ce système ne permet pas la production de particules virales infectieuses, mais a tout de même permis la description des complexes de réplication et du MW (Moradpour D *et al.*, 2004b). Il a permis également, à partir de la lignée d'hépatocarcinome Huh-7, d'obtenir des cellules hautement permissives au VHC, par un traitement à l'INF- α ou γ , générant respectivement les clones Huh-7.5 et Huh-7.5.1 (Blight KJ *et al.*, 2002; Zhong J *et al.*, 2005).

L'étude de l'étape d'assemblage a pu être initiée grâce au développement d'un système en cellules d'insectes utilisant un baculovirus possédant l'ADNc codant les protéines structurales du VHC (Baumert TF *et al.*, 1998). Puis, un autre système a vu le jour utilisant comme vecteur un réplicon dérivé du virus de la forêt de Semliki (SFV) dans des cellules BHK-21 (Blanchard E *et al.*, 2002). Ce système reste le seul permettant de visualiser des événements de bourgeonnement dans le RE de pseudo-particules virales, mais est limité par le caractère abortif du bourgeonnement. En fait, c'est l'absence de système permettant de reproduire la production de particules virales infectieuses qui a longtemps été un frein à la culture du VHC ; réciproquement, il fallut attendre l'établissement du système VHCcc pour étudier les déterminants de l'assemblage viral.

II.3.B.b. Le système de culture cellulaire du VHC (VHCcc)

Les recherches sur le VHC sont entrées dans une nouvelle ère en 2005, lors de la description du premier système de culture cellulaire permettant le cycle entier du virus

incluant la production de nouvelles particules virales infectieuses. Ce système tire parti d'un réplicon développé à partir d'une souche isolée chez un patient japonais atteint d'une hépatite C fulminante (JFH1, pour « japanese fulminant hepatitis »), de génotype 2a (Kato T *et al.*, 2003). Un ADNc du génome viral a été généré puis cloné dans un vecteur d'expression afin de permettre sa transcription *in vitro* (Wakita T *et al.*, 2005). L'ARN généré est électroporé dans des sous-lignées hautement permissives de cellules Huh-7, qui produisent alors des virions infectieux à la fois *in vitro* et *in vivo* chez le chimpanzé (Wakita T *et al.*, 2005; Zhong J *et al.*, 2005). Le même principe a par la suite été appliqué à d'autres souches de VHC, de génotype 1a (Yi M *et al.*, 2006; Li YP *et al.*, 2012; Li YP *et al.*, 2015) ou 1b (Kato T *et al.*, 2007; Pietschmann T *et al.*, 2009; Yi M and Lemon SM, 2009), mais toutes les souches de VHC ne sont pas cultivables, tout au moins pas avec la même efficacité que JFH1. En effet, les protéines non-structurales de ces différentes souches ne permettent pas en culture cellulaire une réplication aussi efficace que celle de JFH1. C'est pourquoi des chimères ont été développées, présentant les protéines structurales de différents génotypes, et les protéines non-structurales de la souche JFH1 (Pietschmann T *et al.*, 2006; Jensen TB *et al.*, 2008; Scheel TK *et al.*, 2008; Gottwein JM *et al.*, 2009). Une étude vient tout juste d'attribuer en partie ce défaut de réplication à l'absence de la protéine SEC14L2 (Saeed M *et al.*, 2015). La seule expression de cette protéine en lignée cellulaire Huh-7.5 suffit à permettre la réplication pangénotypique du VHC, y compris lors de l'inoculation avec du sérum de patient infecté. Mais le niveau de réplication et de production de virus infectieux étant relativement modeste, cette protéine ne suffit pas à elle seule à reproduire les conditions *in vivo*. Il est à noter que SEC14L2 est un régulateur de la voie PI3K/Akt, mais intervient aussi dans le métabolisme du cholestérol (Kempna P *et al.*, 2003; Mokashi V *et al.*, 2005).

La caractérisation des particules virales VHCcc révèle cependant que leur profil est en partie différent de celles produites *in vivo*. Les particules VHCcc ne présentent qu'un pic de densité situé entre 1,10 et 1,15 g/ml, tandis que celles produites *in vivo* chez le chimpanzé présentent un second pic à une densité plus faible, entre 1,02 et 1,05 g/ml, corrélant avec une plus forte infectiosité (Gastaminza P *et al.*, 2006; Lindenbach BD *et al.*, 2006). Comme les LVPs produites *in vivo*, les particules VHCcc sont pourtant associées à des lipoprotéines, mais avec des différences (*cf.* II.1.C.b). Ces différences sont expliquées

par un défaut intrinsèque des Huh-7 dans l'assemblage et la maturation d'authentiques VLDLs (Podevin P *et al.*, 2010; Meex SJ *et al.*, 2011).

L'inaptitude des cellules Huh-7 à sécréter d'authentiques VLDLs proviendrait de l'absence de certains constituants dans le sérum de veau fœtal (SVF) utilisé pour leur culture. Effectivement, la culture des cellules Huh-7 avec du sérum humain rétablit la sécrétion d'authentiques VLDLs (Steenbergen RH *et al.*, 2013). De fait, un pic de particules virales de très faible densité apparaît avec une augmentation concomitante de leur association à l'ApoB, et de leur infectiosité spécifique. La même équipe a déterminé que le sérum humain favorise la sécrétion des VLDLs en stimulant l'expression de PGC-1 α (**Figure 2**), mais aussi celle de CIDEB (Singaravelu R *et al.*, 2013). Les auteurs ont montré que l'élévation d'expression de CIDEB coïncidait avec (1) un accroissement de la taille des GLCs, (2) une diminution intracellulaire de PLIN2 et (3) une sécrétion d'authentiques VLDLs.

II.3.B.c. Cultures d'hépatocytes humains primaires

Dernier modèle à être développé, la culture d'HHP constitue le modèle cellulaire le plus pertinent pour l'étude du VHC. Les hépatocytes sont prélevés à partir de pièces de résection hépatique de patients séronégatifs pour toutes hépatites virales et le virus de l'immunodéficience humaine. Les patients opérés présentent principalement des métastases de cancers colorectaux ou des tumeurs bénignes du foie, et seuls les tissus d'apparence saine autour de la tumeur sont isolés. Les hépatocytes sont ensuite dissociés et ensemencés en une monocouche confluyente. Les conditions de culture, notamment l'ajout d'hydrocortisone, permettent de conserver leurs caractéristiques, à savoir des cellules hautement différenciées, mono ou binucléées, ayant une forme polygonale et possédant un cytoplasme étendu et granuleux avec des inclusions vésiculaires (Hewitt NJ *et al.*, 2007).

Le niveau de différenciation des hépatocytes est évalué par l'expression de certaines protéines plasmatiques, dont l'albumine et des facteurs de la coagulation (Biron-Andreani C *et al.*, 2004) ; certains membres de la famille des cytochromes P450 (CYP), dont notamment CYP2C9 et CYP3A4 (Pascussi JM *et al.*, 2001; Drocourt L *et al.*, 2002; Gerbal-Chaloin S *et al.*, 2002; Assenat E *et al.*, 2004). Il est à noter que CYP3A4 n'est pas exprimé

dans les lignées cellulaires hépatiques (Pascussi JM *et al.*, 2001; Harmsen S *et al.*, 2008; Podevin P *et al.*, 2010).

Etant des cellules non cancéreuses, les PHH ne prolifèrent donc pas et nécessitent d'être ensemencés à forte confluence, condition cruciale à leur viabilité avec la matrice extracellulaire (Dunn JC *et al.*, 1991; Hamilton GA *et al.*, 2001; Raymond VA *et al.*, 2009). Néanmoins, à peine 5 % des hépatocytes sont polarisés dans ce système tandis qu'ils le sont tous dans le foie (Mee CJ *et al.*, 2009). Mais la formation de desmosomes par les jonctions serrées ainsi que la sécrétion dans le surnageant de protéines telle que l'albumine laisse supposer que la face orientée vers le milieu extracellulaire s'apparente au pôle basolatéral des hépatocytes *in vivo* (Decaens C *et al.*, 2008). Cependant, les HHP présente une forte autofluorescence, empêchant raisonnablement toute étude par une approche en immunofluorescence (Gondeau C *et al.*, 2009).

Le premier modèle a consisté en la culture d'HHP provenant de patients infectés par le VHC, permettant de détecter à la fois la présence de brins d'ARN de polarité positive et de particules virales infectieuses dans le surnageant de culture (Ito T *et al.*, 1996). Ces surnageants permettent l'infection d'HHP naïfs, mais aboutissent à une réplication très faible du virus. Une autre stratégie a ensuite été entreprise, en inoculant des HHP naïfs avec des sérums de patients infectés (Fournier C *et al.*, 1998; Rumin S *et al.*, 1999; Castet V *et al.*, 2002). Si l'infection par des VHCser de génotype 1 à 5 est possible dans ce second modèle, la reproductibilité était aléatoire et les niveaux de réplication étaient faibles et imprévisibles (Carriere M *et al.*, 2006; Molina S *et al.*, 2007; Buck M, 2008). Récemment, l'identification de constituants sériques influençant l'infection et la sélection de certains sérums de patients infectés par le VHC (de génotype 1b et 3a) ont permis d'atteindre une réplication virale efficace (Gondeau C *et al.*, 2014). En revanche, les auteurs n'ont pas examiné la production de virus infectieux.

Molina et collaborateurs ont montré que l'inoculation des HHP naïfs par des particules VHCcc (génotype 2a, JFH1) plutôt que par des VHCser est plus avantageuse aussi bien pour la reproductibilité que pour le niveau de la réplication virale (Molina S *et al.*, 2008). En effet, la quantité d'ARN de polarité positive du VHC est dix fois plus élevée que celle observée avec les VHCser, même si elle demeure dix fois moins importante que celle obtenue en cellules Huh-7.5 avec la même souche et à multiplicité d'infection (MOI) égale.

En revanche, l'inoculation des HHP avec des particules VHC_{cc} de la chimère J6/JFH1 permet d'aboutir à un niveau de réplication similaire à celui en cellules Huh-7.5 (Mee CJ *et al.*, 2009). Cependant, aucune des équipes n'a rapporté la production de particules virales infectieuses, ou du moins à un niveau détectable permettant d'étudier les propriétés des particules virales produites (Ploss A *et al.*, 2010). C'est en 2010 que notre équipe a décrit pour la première fois en HHP un modèle d'infection productive par le VHC de génotype 2a (JFH1) mais aussi 2a/1b (chimère Con1/C3) (Podevin P *et al.*, 2010). En effet, la production de particules virales infectieuses atteint dans ce modèle 10^4 à 10^6 unités formant foyer (uff)/ml, couplée à un niveau élevé de la réplication intracellulaire de l'ordre de 10^6 copies/ μ g d'ARN. De façon intéressante, ces particules virales produites en culture primaire d'hépatocytes (VHC_{pc}) sont caractérisées par une infectiosité spécifique plus élevée et une densité plus faible. Ces observations sont cohérentes avec l'enrichissement des particules virales en lipides, phénomène pouvant être expliqué par l'aptitude des HHP à sécréter d'authentiques VLDLs, contrairement à la lignée Huh-7 (Podevin P *et al.*, 2010; Meex SJ *et al.*, 2011). Cela est confirmé par la perte d'infectiosité spécifique et l'augmentation de densité des particules virales produites lors de l'inoculation de cellules Huh-7.5.1 par des VHC_{pc}.

Ce modèle permet donc à la fois la sécrétion d'authentiques VLDLs et la production de particules virales dont les propriétés sont les plus proches *in vitro* de celles des VHC_{ser} *in vivo*. Il constitue donc un modèle de choix, car physiologiquement pertinent pour la validation de drogues antivirales (Haid S *et al.*, 2012), et l'étude la plus fidèle possible des interactions entre le VHC et sa cellule hôte naturelle (Herker E *et al.*, 2010).

III. VHC et stéatose hépatique

III.1. Observations cliniques

La définition *stricto sensu* de la stéatose hépatique est une accumulation de lipides au sein des hépatocytes, de façon majoritaire sous forme de TAGs (Review T *et al.*, 2014). En effet, les espèces lipidiques prédominantes dans les hépatocytes sont les TAGs, suivis du cholestérol sous ses deux formes. Il en existe deux formes cliniques, hors contexte alcoolique : la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD, pour « nonalcoholic fatty liver disease ») et la stéato-hépatite non alcoolique (NASH, pour « non-alcoholic steatohepatitis »). La NASH est la forme sévère de la NAFLD, présentant en plus de

l'accumulation de lipides une inflammation et des lésions hépatiques. Elle est de moins bon pronostic évoluant plus fréquemment vers une cirrhose et un CHC. La NASH et la NAFLD représentent la première cause de maladies hépatiques dans les pays occidentaux et peuvent être associées à une insulino-résistance, une hyperlipidémie ou encore l'obésité. Chez les patients atteints d'hépatite C chronique, une stéatose hépatique est retrouvée dans 40 % des cas (Asselah T *et al.*, 2006). Cette prévalence est la plus élevée des maladies chroniques du foie, les patients atteints d'hépatite B ne présentant une stéatose que dans 20 % des cas (Rubbia-Brandt L *et al.*, 2000; Thomopoulos KC *et al.*, 2006). L'occurrence peut augmenter jusqu'à 80 % si les patients infectés par le VHC présentent des facteurs d'aggravation tels que la consommation d'alcool, le diabète, ou l'obésité. Chez les patients infectés par le VHC de génotype 3, la stéatose est également plus fréquente et aussi plus sévère, évoluant plus fréquemment vers une cirrhose et un CHC (Mihm S *et al.*, 1997; Rubbia-Brandt L *et al.*, 2000; Adinolfi LE *et al.*, 2001; Castera L *et al.*, 2004; Goossens N and Negro F, 2014b). Ce génotype aurait donc un pouvoir stéatogénique direct, ou du moins plus important, par rapport aux autres génotypes car :

- La charge virale corrèle avec la sévérité de la stéatose de façon plus significative pour le génotype 3 (Rubbia-Brandt L *et al.*, 2000; Adinolfi LE *et al.*, 2001).

- La stéatose est réduite, voir disparaît, chez les patients atteints d'un génotype 3 et répondant aux traitements antiviraux, tandis que la stéatose peut persister chez les patients infectés par d'autres génotypes, et ce même en cas de réponse prolongée (Kumar D *et al.*, 2002; Poynard T *et al.*, 2003). De plus, une rechute pour le génotype 3 est associée à une réapparition de la stéatose (Kumar D *et al.*, 2002; Poynard T *et al.*, 2003).

III.1.A. Protéine de capsid et stéatose

Les patients chroniquement infectés par le VHC présentent couramment une stéatose hépatique, qui est associée de façon plus fréquente au génotype 3 (Rubbia-Brandt L *et al.*, 2000; Negro F and Sanyal AJ, 2009). La protéine C de génotypes 3 et 1 ont été décrites comme des acteurs majeurs du développement de la stéatose, *id est* l'accumulation de lipides au sein de la cellule (Lerat H *et al.*, 2002; Qiang G *et al.*, 2009). La protéine C active la voie de synthèse des lipides par l'activation de SREBP, tout en inhibant leur voie de sécrétion, au même titre que lors d'un apport en glucose (*cf.* Chapitre 1 : I.1.C), mais aussi leur catabolisme (Syed GH *et al.*, 2010) (*cf.* III). Il a également été décrit que l'expression

de la protéine C induit une inhibition de PLIN3 à la surface des GLCs (McLauchlan J, 2000), PLIN la plus exprimée sur les GLCs de plus petites tailles et quasi inexprimée à mesure de l'avancée de la stéatose (*cf.* Chapitre 1 : II.1.C.a) (Pawella LM *et al.*, 2014). Ces résultats impliquent donc la protéine C comme un acteur de la stéatose, par l'inhibition de la sécrétion des lipides, et peuvent expliquer l'hypobétalipoprotéïnémie observée chez les patients chroniquement infectés (Serfaty L *et al.*, 2001; Petit JM *et al.*, 2003; Mirandola S *et al.*, 2006).

III.2. Mécanismes d'induction

La stéatose viro-induite n'est pas due à l'altération d'une simple et unique voie, mais d'un ensemble, allant de la capture des lipides à partir du sang jusqu'à leur rétention, en passant par une augmentation de leur synthèse et une inhibition de leur dégradation au sein de la cellule (**Figure 26**). Le VHC accroît ainsi la synthèse de lipides en modulant le niveau d'expression des gènes impliqués dans la gluconéogenèse et la lipogenèse (Su AI

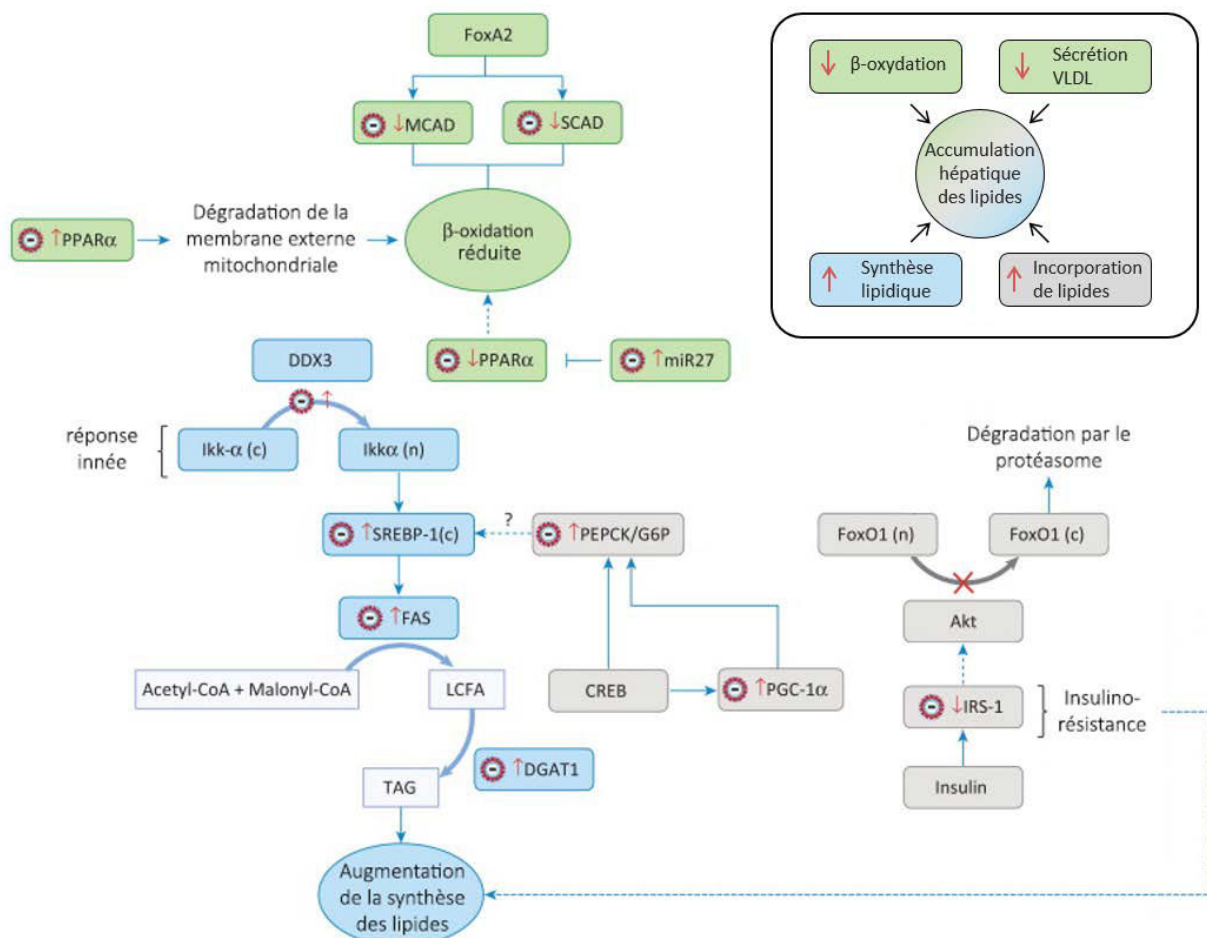


Figure 26 : Mécanismes d'induction de la stéatose par le VHC
d'après (Filipe A and McLauchlan J, 2015)

et al., 2002; Diamond DL *et al.*, 2010) dont : SREBP-1 (Kapadia SB and Chisari FV, 2005; Waris G *et al.*, 2007; Olmstead AD *et al.*, 2012), la glucose 6 phosphatase (Banerjee A *et al.*, 2010), la FAS (Bose SK *et al.*, 2014) et DGAT1 (Parvaiz F *et al.*, 2014). La voie de la lipogénèse est également activée en amont de SREBP-1 *via* le recrutement de DDX3 par l'extrémité 3'NCR du VHC, favorisant ainsi la formation de GLCs (Li Q *et al.*, 2013).

Les études cliniques montrent que les patients atteints d'hépatite C sont plus enclins à développer une insulino-résistance de type 2 (Negro F, 2011; Goossens N and Negro F, 2014a). En effet, la stéatose peut induire une insulino-résistance, et inversement, mais les mécanismes mis en jeu ne sont pas totalement élucidés (Weickert MO and Pfeiffer AF, 2006; Bose SK *et al.*, 2012). PTEN serait un acteur important dans la liaison entre ces deux pathologies, car étant un régulateur de la voie de l'insuline, il est sous-exprimé lors de la stéatose viro-induite par le génotype 3 chez les patients (Clement S *et al.*, 2011). De plus, l'extinction de PTEN chez la souris induit une NAFLD qui évolue progressivement vers une NASH, puis un CHC (Horie Y *et al.*, 2004).

En parallèle de la synthèse de lipides, l'inhibition de la β -oxydation des AGs est également un des mécanismes responsables de la stéatose, provoquant une diminution de sécrétion des VLDLs. Elle s'opère par l'inhibition d'expression de PPAR- α qui est observée chez les patients, et gouvernée par miR27 et l'extrémité 3'NCR (Dharancy S *et al.*, 2005; Singaravelu R *et al.*, 2014a). La protéine C permet également l'inhibition de la β -oxydation par deux voies distinctes. La première est celle faisant intervenir la voie de FoxA2 et ses deux partenaires, la medium et la « short-chain-acyl-deshydrogenase » (respectivement MCAD et SCAD). L'infection par le VHC comme l'expression de la protéine C seule inhibent *in vitro* MCAD et SCAD (Bose SK *et al.*, 2014). La seconde voie est médiée par l'activation de PPAR- α . Cette observation faite *in vitro* et *in vivo* en modèle murin est contradictoire de prime abord avec miR27, mais s'explique par un mécanisme d'action différent où l'augmentation de PPAR- α induit la dégradation de la membrane externe mitochondriale (Barbaro G *et al.*, 1999; Okuda M *et al.*, 2002; Tanaka N *et al.*, 2008).

Enfin, il est à noter que l'absence de modèle pertinent pour l'étude de la stéatose ne permet pas une description exhaustive des mécanismes impliqués dans ce processus. La génération d'une nouvelle souche de génotype 3a intégral par la sélection de mutations adaptatives, appelée S310, semble un outil prometteur dans l'étude de la stéatose (Kim S

et al., 2014). En effet, cette souche permet pour la première fois d'atteindre un taux élevé d'infection en lignée Huh-7 avec un génome de type 3 et cause une accumulation intracellulaire de petites GLCs apparentée à la stéatose micro-vésiculaire observée chez certains patients (Felmlee DJ *et al.*, 2014; Kim S *et al.*, 2014).

Résultats

Le métabolisme lipidique hépatocytaire joue un rôle central dans le cycle infectieux du VHC, et ce dès l'entrée du virus jusqu'à la sécrétion des nouvelles particules virales sous forme de complexes avec les VLDLs. Cette frontière viro-métabolique originale explique en partie le tropisme du VHC pour les hépatocytes. Malgré les progrès considérables dans la compréhension du cycle viral, l'étape de morphogénèse demeure la moins comprise. En 2007, Miyanari *et al.* ont décrit les GLCs comme une plate-forme d'assemblage du virus, où convergent tous les acteurs de la morphogénèse. Les GLCs stockent les lipides neutres au sein d'une monocouche de PLs, principalement la phosphatidylcholine, à laquelle sont associées des protéines, dont des enzymes du métabolisme lipidique. Les GLCs participent à la synthèse des VLDLs par le transfert des lipides à la membrane du RE, et voient leur localisation ainsi que leur taille modifiées lors de l'infection par le VHC. Il est donc logique de supposer que le VHC détourne le métabolisme lipidique des GLCs au profit de la production de LVPs. Moessinger et collaborateurs ont décrit que LPCAT1, une enzyme catalysant la synthèse de PLs directement à la surface des GLCs, est localisée à la surface des GLCs avec pour conséquence un remodelage de ces dernières (Moessinger C *et al.*, 2011; Moessinger C *et al.*, 2014). Dans ce contexte, mes travaux de thèse se sont focalisés sur l'étude du détournement de cette voie par le VHC, puis ont précisé le rôle de LPCAT1 à la fois dans le cycle infectieux du VHC et dans le métabolisme lipidique hépatocytaire.

Tout d'abord, nous avons montré que l'infection *de novo* par le VHC en lignée hépatocytaire Huh-7 induisait une diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine LPCAT1, suggérant une régulation transcriptionnelle de cette enzyme par le VHC (Fig.1). Afin d'étudier l'impact de LPCAT1 sur le cycle infectieux, nous avons inoculé avec la souche JFH1 des cellules de lignée Huh-7.5.1 préalablement déplétées pour LPCAT1. Si l'extinction de LPCAT1 n'avait aucun impact sur la réplication du génome viral, elle augmentait la production de particules virales infectieuses, révélant donc un rôle dans la morphogénèse du VHC (Fig.2A). Afin de déterminer si cette augmentation corrèle seulement avec une augmentation de la production virale, ou bien un gain d'infectiosité des particules, les deux hypothèses n'étant pas mutuellement exclusives, nous avons quantifié la charge virale dans les surnageants de culture. Le fait qu'elle n'augmentait pas

significativement nous a permis d'en déduire que l'extinction de LPCAT1 amplifie l'infectiosité spécifique des particules virales. L'infectiosité des particules virales étant inversement proportionnelle à leur densité, nous avons ensuite caractérisé la densité des particules virales produites en gradient d'iodixanol. Une augmentation de la proportion des particules virales de plus faibles densités a ainsi été décelée, compatible avec un enrichissement en TAGs des particules virales (Fig2B).

Dans le but d'étudier le rôle de LPCTA1 dans le métabolisme lipidique, nous avons ensuite éteint l'expression de LPCAT1 en cellules Huh-7.5.1, infectées ou non. Lors de l'extinction de LPCAT1 et de façon indépendante de l'infection, une diminution du nombre de GLCs a été observée avec une augmentation de leur taille moyenne, suggérant une fusion des GLCs (Fig.3 & 4, A-C). Nous avons également observé une accumulation intracellulaire de TAGs à l'état d'équilibre, indiquant que l'augmentation de la taille des GLCs n'est pas uniquement due à une éventuelle fusion des GLCs (Fig.3 & 4 D). La sécrétion des lipides était également affectée puisque la quantité à la fois des TAGs néosynthétisés (Fig.3F) et d'ApoB (Fig.3 & 4, E) étaient plus élevée dans les surnageants, attestant d'une augmentation de la production de VLDLs. En revanche, l'absorption des lipides n'était pas affectée. De façon intéressante, l'excès d'ApoB sécrétée était retrouvé à la densité des particules virales (Fig.4F).

La dernière étape de cette étude était de valider les résultats dans un modèle plus pertinent aussi bien pour la culture du virus, que pour le métabolisme hépatique. L'extinction de LPCAT1 dans ce modèle a validé l'augmentation d'infectiosité. Ainsi, nous avons utilisé notre modèle de culture du virus en HHP, et avons déterminé que plus le niveau d'infection était élevé, plus le niveau d'expression de LPCAT1 était faible (Fig.5A-B). L'infectiosité spécifique des particules virales produites, qui corrélait de fait avec une diminution de leur densité (Fig.5C-D).

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer un modèle dans lequel la diminution d'expression de LPCAT1, induite par le VHC, serait une stratégie virale pour détourner le métabolisme hépatocytaire des TGs au profit de la production des LVPs, hautement infectieuses.

Ces travaux ont d'ores et déjà été soumis pour publication.

Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 is downregulated by hepatitis C virus: impact on production of lipo-viro-particles

Frauke Beilstein^{1,2,†}, Matthieu Lemasson^{3,†}, Véronique Pène³, Arielle R. Rosenberg^{3,4,*‡}, Sylvie Demignot^{1,2,*‡}

† or ‡: These authors contributed equally to this work.

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Inserm, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR_S 1138, Centre de recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France

² EPHE, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, F-75014, Paris, France

³ Université Paris Descartes, EA 4474 « Virologie de l'Hépatite C », F-75014, Paris, France

⁴ AP-HP, Groupe Hospitalier Cochin, Service de Virologie, F-75014, Paris, France

*** Corresponding authors:**

- Sylvie Demignot

Address:

UMR_S1138, Centre de Recherche des Cordeliers,
15 Rue de l'Ecole de Médecine,
75006 Paris, France

Telephone number: +33(0)144272411

Fax number: +33(0)143251615

E-mail address: sylvie.demignot@crc.jussieu.fr

- Arielle R. Rosenberg

Address:

EA 4474 « Virologie de l'Hépatite C »,
Institut Cochin, Bâtiment Méchain, 2e étage,
22 Rue Méchain,
75014 Paris, France

Telephone number: +33(0)140516493

Fax: +33(0)140516454

E-mail address: arielle.rosenberg@parisdescartes.fr

Abbreviations:

HCV, hepatitis C virus; TAG, triacylglycerol; LD, lipid droplet; ApoB, Apolipoprotein B; LVP, lipo-viro-particle; VLDL, very low density lipoprotein; PL, phospholipid; LPCAT, lysophosphatidylcholine acyltransferase; BSA, bovine serum albumin; PHH, primary human hepatocytes; RT-qPCR, quantitative reverse-transcription real-time polymerase chain reaction; ffu, focus-forming units; shLPCAT1, small hairpin RNA against LPCAT1; shLuc, small hairpin RNA against luciferase; siLPCAT1, small interfering RNA against LPCAT1; siGFP, small interfering RNA against green fluorescent protein.

Keywords: cytosolic lipid droplet; hepatitis C virus; infectious virus production; lipo-viro-particle; liver lipid metabolism; lysophosphatidylcholine acyltransferase 1; primary human hepatocyte; specific infectivity; triacylglycerol-rich lipoprotein; very low density lipoprotein

Conflict of interest: The authors declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Financial support: FB was the recipient of postdoctoral fellowships from ANRS (France REcherche Nord&Sud Sida-hiv Hépatites) and EPHE. ML and VP were the recipients of doctoral or postdoctoral fellowships from ANRS, respectively. This work was supported by ANRS, Université Paris Descartes and Inserm.

Authors' contributions:

FB, ML, ARR and SD conceived and designed the study. FB, ML and VP performed the experiments. FB, ML, VP, ARR and SD analyzed and interpreted the data. FB, ML, ARR and SD drafted or wrote the manuscript. ARR and SD obtained funding. All authors approved the final version for submission.

Abstract

Background & Aims: Hepatitis C virus (HCV) is intimately linked with the liver lipid metabolism, devoted to the efflux of triacylglycerols stored in lipid droplets (LDs) in the form of triacylglycerol-rich lipoproteins: (i) the most infectious HCV particles are those of lowest density due to association with triacylglycerol-rich lipoproteins; (ii) HCV-infected patients frequently develop hepatic steatosis (increased triacylglycerol storage). The recent identification of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) as an LD phospholipid-remodelling enzyme prompted us to investigate its role in liver lipid metabolism and HCV infectious cycle.

Methods: Huh-7.5.1 cells and primary human hepatocytes (PHH) were infected with JFH1-HCV. LPCAT1 depletion was achieved by RNA interference. Cells were monitored for LPCAT1 expression, lipid metabolism and HCV production and infectivity. The density of viral particles was assessed by isopycnic ultracentrifugation.

Results: Upon HCV infection, both Huh-7.5.1 cells and PHH had decreased levels of LPCAT1 transcript and protein, consistent with transcriptional downregulation. LPCAT1 depletion in either naïve or infected Huh-7.5.1 cells resulted in altered lipid metabolism characterized by LD remodelling, increased triacylglycerol storage and increased secretion of triacylglycerol-rich lipoproteins. In infected Huh-7.5.1 cells or PHH, LPCAT1 depletion increased production of the viral particles of lowest density and highest infectivity.

Conclusions: We have identified LPCAT1 as a modulator of liver lipid metabolism downregulated by HCV, which appears as a viral strategy to increase the triacylglycerol content and hence infectivity of viral particles. Targeting this metabolic pathway may represent an attractive therapeutic approach to reduce both the viral titre and hepatic steatosis.

Introduction

The hepatitis C virus (HCV) is a leading cause of chronic liver disease worldwide. Unique to this human hepatotropic virus is its tight link with the host lipid metabolism [1-3]. Clinical evidence in chronically infected patients has long recognized the high prevalence of liver steatosis, defined as an accumulation of lipids, essentially accounted for by triacylglycerols (TAGs), in cytosolic lipid droplets (LDs) of hepatocytes. Moreover, HCV particles are heterogeneous in the circulating blood of patients and the most infectious viral particles are those of exceptionally low buoyant density due to their association with apolipoprotein B

(ApoB)-containing TAG-rich lipoproteins in original structures referred to as lipo-viro-particles (LVPs) [4, 5]. As hepatocytes are specialized in the assembly and secretion of the ApoB-containing TAG-rich lipoproteins known as very-low-density lipoproteins (VLDLs), a working hypothesis is that LVPs are formed originally within infected cells, the hepatocellular lipid metabolism being hijacked by HCV for the benefit of their morphogenesis [6-8].

LDs consist of a core of TAGs and cholesterol esters surrounded by a monolayer of phospholipids (PLs) and cholesterol [9]. In hepatocytes, major metabolic relationships exist between cytosolic LDs and VLDLs: indeed, TAGs stored in cytosolic LDs provide most of the TAGs present in VLDLs through a mechanism of hydrolysis-reesterification [10, 11]. Many proteins interact with the LD surface, as shown by proteomic characterization of LDs isolated from hepatic cells [12, 13]. The LD proteome includes structural proteins, perilipins, and proteins that control several cellular pathways including lipid metabolism (e.g., lipases, acyltransferases), membrane trafficking, signalling, etc. [14, 15]. The interaction of these proteins with the LD surface can be modulated through mechanisms, probably of multiple causes, that are just only starting to be clarified [16, 17]. Because of the large variety of PLs conferring different physicochemical properties to the LD surface, the nature of PLs is a factor that can modulate the strength of protein association [18, 19]. The most abundant PL of the LD surface is phosphatidylcholine [20]. The lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT) family consists of PL-remodelling enzymes [21] and LPCAT1, which is expressed in hepatocytes, was recently reported to interact with the surface of cytosolic LDs and to influence lipoprotein secretion from these cells [22, 23].

These considerations prompted us to investigate a potential involvement of LPCAT1 in HCV infection. Indeed, LPCAT is shown here to be downregulated by HCV. LPCAT1 depletion, in turn, was found to increase the virus infectivity.

Materials and Methods

Cell culture and infection

Huh-7.5.1 cells were cultured as described previously [24] and, where indicated, incubated with 0.6 mM oleic acid in complex with bovine serum albumin (BSA) for the last 24 h of culture to promote LD formation (see the Supplementary material). Primary human hepatocytes (PHH) purchased from Biopredic (Rennes, France) were seeded at a density of 1.6×10^5 viable

cells/cm² and maintained in culture as described previously [25]. A JFH1-HCV stock [25] was used to inoculate Huh-7.5.1 cells and PHH as described in the Supplementary material.

Gene silencing

Three days post-seeding, PHH were transfected with 20 nM siRNA (Eurogentec) using RiboCellin (BioCellChallenge) according to the manufacturer's instructions. The siRNA sequences were GGACCUGCCUAAUUACCUUtt and GAACGGCAUCAAGGUGAACtt for LPCAT1 and GFP, respectively. After 3 days, cells were washed with phosphate-buffered saline then inoculated or not with HCV. ShRNA-mediated gene silencing was achieved in Huh-7.5.1 cells as described in the Supplementary material.

Transcript and protein expression analyses

For details of quantitative reverse-transcription real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), western blotting, confocal microscopy and ApoB quantification, see the Supplementary material.

Virological analyses

Intracellular amounts of negative-strand HCV RNA were quantified by a RT-qPCR technique described previously [26]. HCV RNA amounts in filtered cell culture supernatants or in iodixanol gradient fractions were quantified by the Abbott RealTime HCV viral load assay; infectivity titres were assessed by focus-formation assay and expressed as focus-forming units (ffu)/ml [24, 25]. The buoyant densities of viral particles were determined by isopycnic iodixanol gradient ultracentrifugation, as previously described [25].

Lipid analyses

Lipids were extracted from cells and media with chloroform/methanol (2:1, v/v) and dried as described previously [27]. The TAG mass was quantified using the PAPI50TG kit (BioMérieux) according to the manufacturer's instructions with the modifications described in the Supplementary material. For lipid secretion analysis, cells were incubated for 24 h with oleic acid (0.6 mM)/BSA containing 1 µCi/ml [1-¹⁴C] oleic acid, then lipids were extracted from cells and media and fractionated by thin layer chromatography followed by quantification of radioactivity as described previously [27] and detailed in the Supplementary material.

Statistical analyses

Results were expressed as mean \pm SD of at least three independent experiments. Statistical significance was evaluated using Student's *t* test for unpaired two-sided data (* for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$).

Results

LPCAT1 is downregulated by HCV infection

To investigate whether HCV infection affects LPCAT1 expression, Huh-7.5.1 cells were inoculated or not with JFH1-HCV and the amounts of LPCAT1 protein and mRNA were assessed by western blot and RT-qPCR analyses, respectively (Fig. 1A-B). LPCAT1 expression was significantly reduced both at protein and mRNA levels upon HCV inoculation (0.72 ± 0.06 and 0.81 ± 0.12 , respectively), suggesting transcriptional downregulation of this enzyme by HCV. Immunofluorescence in situ also confirmed the reduction in LPCAT1 expression level upon HCV inoculation (0.56 ± 0.31 of LPCAT1 signal intensity) (Fig. 1C). Most importantly, while LPCAT1 downregulation appeared moderate when assessed at the total cell population level, confocal microscopy analysis showed that at the single cell level, those cells that were actually infected upon HCV inoculation had a drastic decrease in LPCAT1 expression compared to non-infected cells (Fig. 1C, compare cells positive and negative for HCV core protein). We concluded that LPCAT1 expression is downregulated in HCV-infected cells.

LPCAT1 depletion increases production of HCV particles with high infectivity and low density

Next we wanted to determine whether LPCAT1 downregulation has an impact on HCV infectious cycle. To address this question, we used a lentiviral vector coding shRNA against LPCAT1 (shLPCAT1). In Huh-7.5.1 cells, this indeed resulted in a strong decrease in LPCAT1 protein and mRNA amounts compared to control cells treated with lentivirus coding shRNA against luciferase (shLuc) (0.34 ± 0.1) (Supplementary Fig. 1A-B). This depletion was specific to LPCAT1 as the mRNA amount of LPCAT3, the main LPCAT in liver cells [28], remained unchanged (Supplementary Fig. 1C). An even stronger decrease in LPCAT1 protein and mRNA amounts was observed in shLPCAT1-transduced Huh-7.5.1 cells that were inoculated with HCV (0.17 ± 0.07 and 0.20 ± 0.04 , respectively), suggesting an additive effect of HCV infection

and shLPCAT1 on LPCAT1 depletion (Supplementary Fig. 1D-E). We also verified that shLPCAT1 transduction had no cytotoxic effect (Supplementary Fig. 2A).

To examine the impact of LPCAT1 depletion on HCV infectious cycle, we first used an infectivity assay to evaluate the production of infectious virus in the culture supernatant. The infectivity titre was significantly increased in LPCAT1-depleted Huh-7.5.1 cells (5.84 ± 2.08) (Fig. 2A). However, this effect could not be attributed to increased replication of viral genome because the amount of negative-strand HCV RNA was not modified. These results pointed to viral morphogenesis as the step of HCV infectious cycle affected by LPCAT1 depletion. Nevertheless, LPCAT1 depletion had only a slight, not significant tendency to increase the viral load, which reflects the production of physical viral particles irrespective of whether they are infectious or not. Accordingly, the specific infectivity (calculated as the ratio of infectious titre to viral load) was significantly increased in LPCAT1-depleted cells (3.83 ± 1.69), suggesting that LPCAT1 depletion favours the morphogenesis of highly infectious virus. Because HCV infectivity is inversely correlated with the buoyant density of viral particles [25, 29], we subjected culture supernatants from HCV-infected Huh-7.5.1 cells depleted or not for LPCAT1 to isopycnic ultracentrifugation through iodixanol gradients (see a representative experiment in Fig. 2B). As previously reported for HCV grown in Huh-7 cell line [25, 29], the majority of viral RNA peaked between 1.09 and 1.14 g/ml. However, LPCAT1 depletion led to a shift of HCV RNA towards fractions of lower buoyant density: the percentage of the total viral load present below 1.08 g/ml was 13.31 % for LPCAT1-depleted cells as compared to 5.80 % for control cells. Taken together, the results indicate that LPCAT1 depletion increases the production of highly infectious HCV particles with low buoyant density.

LPCAT1 depletion leads to LD remodelling, increased TAG storage and increased secretion of TAG-rich lipoproteins

The lower buoyant density of HCV produced upon LPCAT1 depletion was consistent with a TAG enrichment of viral particles, prompting us to examine the impact of LPCAT1 depletion on the hepatocellular lipid metabolism. Confocal microscopy of Huh-7.5.1 cells labelled with BODIPY 493/503 did not show any gross modification of the intracellular LD distribution upon LPCAT1 depletion (Fig. 3A). However, the mean number of LDs was significantly reduced in LPCAT1-depleted cells compared to control cells (153.20 ± 37.89 and 352.12 ± 78.14 LDs per cell, respectively) (Fig. 3B). Furthermore, measurement of LD size showed a shift of the LD diameter distribution towards larger LDs upon LPCAT1 depletion (Fig. 3C). Besides these

modifications that might reflect fusion of small LDs into larger ones, the net intracellular TAG content was increased in the steady state in LPCAT1-depleted cells (1.72 ± 0.71) (Fig. 3D). Because hepatic cells produce TAG-rich lipoproteins, the increased intracellular TAG content observed in LPCAT1-depleted cells could result from an inhibition of TAG secretion in the form of lipoproteins. To test this hypothesis, Huh-7.5.1 cells were subjected to metabolic labelling with [$1\text{-}^{14}\text{C}$] oleic acid then radiolabelled PLs and TAGs were quantified in cells and media. Surprisingly, whereas the intracellular amounts of newly synthesized PLs and TAGs were similar in LPCAT1-depleted and control cells, the secretion of newly synthesized TAGs was significantly increased in LPCAT1-depleted cells (1.24 ± 0.15 fold) while PL secretion was not modified (Fig. 3F). The amount of ApoB, the constitutive apolipoprotein of TAG-rich lipoproteins, was also increased in the culture supernatant of LPCAT1-depleted compared to control cells (423.28 ± 84.19 and 175.77 ± 34.35 $\mu\text{g}/\text{dl}$, respectively) (Fig. 3E). We concluded that LPCAT1 depletion in Huh-7.5.1 cells results in an altered lipid metabolism characterized by LD remodelling, increased intracellular TAG content and increased TAG secretion.

Next we examined the impact of LPCAT1 depletion on the hepatocellular lipid metabolism in the context of HCV infection. For all characteristics studied, similar effects were observed in LPCAT1-depleted Huh-7.5.1 cells irrespective of whether they were infected or not. Indeed, LPCAT1 depletion led to a reduction in the mean number of LDs accompanied by a shift of the LD diameter distribution towards larger LDs in infected Huh-7.5.1 cells (Fig. 4A-C). Of note, these changes did not induce any gross modification of the subcellular localization of HCV core protein, which was found mostly around LDs in the steady state (Fig. 4A). Moreover, the intracellular TAG content and the amount of secreted ApoB were both increased upon LPCAT1 depletion in infected Huh-7.5.1 cells (Fig. 4D-E). Upon isopycnic iodixanol gradient ultracentrifugation, ApoB peaked at a higher buoyant density than the very low density (<1.006 g/ml) expected for VLDLs (Fig. 4F), consistent with the reported inability of the Huh-7 cell line to secrete genuine VLDLs [25, 30]. Nevertheless, ApoB was found in fractions with a density below 1.08 g/ml (Fig. 4F), i.e., in the density range of the excess of HCV particles produced upon LPCAT1 depletion (Fig. 2B). Taken together, the results suggest that LPCAT1 depletion increases the secretion of TAG-rich lipoproteins and HCV particles associated with TAG-rich lipoproteins.

Validation of data in physiologically relevant PHH

Huh-7 sublines provide a most convenient and efficient HCV culture system, yet differ significantly from normal, quiescent, highly differentiated human adult hepatocytes and especially do not fully reproduce VLDL biogenesis [25, 30]. In order to validate the data in a patho-physiologically relevant model, we used our HCV culture system in PHH, which produce genuine VLDLs and HCV particles whose properties mimic those of infectious HCV produced in vivo [25]. We first sought to determine whether HCV infection downregulates LPCAT1 expression in PHH as is the case in Huh-7.5.1 cells. Because PHH are primary cells, the infectivity titres reached upon JFH1-HCV inoculation were generally lower than those obtained in Huh-7.5.1 cells and varied from one donor of hepatocytes to another. When viral titres were below 5×10^4 ffu/ml, LPCAT1 mRNA amounts were not modified in PHH inoculated with HCV compared to naïve PHH (Fig. 5A). When higher titres were reached, however, a reduction in LPCAT1 mRNA amounts was observed, and a strong linear inverse relationship was found between LPCAT1 expression levels and HCV infectivity titres (Fig. 5B), consistent with the occurrence of HCV-induced transcriptional downregulation of LPCAT1 in PHH.

Next we investigated the impact of LPCAT1 depletion on HCV infectious cycle in PHH. For this, PHH were transfected with siRNA against LPCAT1 (siLPCAT1) versus GFP (siGFP), then inoculated with HCV. A significant decrease in LPCAT1 protein amount was observed in PHH transfected with siLPCAT1 compared to control (0.37 ± 0.05) (Supplementary Fig. 1F), in the absence of cytotoxic effect (Supplementary Fig. 2B). LPCAT1 depletion in PHH had no impact on HCV genome replication but increased the infectivity titre by almost 1 log (9.27 ± 5.60) (Fig. 5C), indicating an effect on virus morphogenesis. However, the viral load was not significantly modified, therefore the specific infectivity of viral particles produced was increased in LPCAT1-depleted PHH (7.87 ± 5.14). Upon isopycnic ultracentrifugation through iodixanol gradients, the proportion of viral RNA-containing particles with a buoyant density below 1.08 g/ml was greater for HCV grown in PHH than for HCV grown in Huh-7.5.1 cells (compare siGFP in Fig. 5D with shLuc in Fig. 2B), as previously reported [25]. Nevertheless, a further shift of HCV RNA towards low buoyant density fractions was observed upon LPCAT1 depletion in PHH: the percentage of the total viral load present below 1.09 g/ml was 46.28 % for LPCAT1-depleted cells as compared to 36.59 % for control cells in the representative experiment shown in Fig. 5D. Thus, in PHH as in Huh-7.5.1 cells but even more strikingly,

LPCAT1 depletion appeared to favour the morphogenesis of highly infectious particles with low buoyant density.

Discussion

The human hepatocyte is both the cell type specialized in the biogenesis of VLDLs, which permit export of TAGs into the circulation, and the primary replication site of HCV, which circulates in the form of TAG-rich LVPs. Using two cell-culture-based models of human hepatocytes, we have here identified LPCAT1 as a host cell factor downregulated upon HCV infection. Depletion of this PL-remodelling enzyme was further found to affect TAG metabolism, leading to increased intracellular availability of TAGs and increased secretion of TAG-rich lipoproteins. In infected hepatocytes this also resulted in increased production of HCV particles of lowest buoyant density due to TAG enrichment, which are those of highest infectivity. Thus, LPCAT1 downregulation by HCV appears as an original viral strategy to increase the virus specific infectivity. These data support the idea that HCV hijacks the hepatocellular lipid metabolism, which is devoted in particular to the efflux of TAGs in the form of VLDLs, for the benefit of LVP morphogenesis.

High-throughput profiling studies in the Huh-7/JFH1 model have suggested that HCV regulates the expression of host genes involved in a variety of hepatocellular processes, including liver lipid metabolism, at the transcriptional, translational and post-translational levels [31-34]. Our study reveals a decrease in the amounts of both LPCAT1 mRNA and protein in JFH1-infected Huh-7.5.1 cells, consistent with HCV-induced downregulation of LPCAT1 expression occurring at least partly at the transcriptional level. The PHH model is less suitable for such studies owing to lower levels of HCV infection and to the notorious autofluorescence of these cells that precludes *in situ* immunofluorescence analysis [25]. Our finding of a strong linear correlation between HCV infectious titre and LPCAT1 mRNA amount is all the more striking in view of these limitations, supporting the occurrence of transcriptional downregulation of LPCAT1 by HCV in a patho-physiologically relevant model. Further studies are needed to define the exact mechanism and the virus component(s) involved in this host gene regulation. One candidate for this function might be HCV core protein because this multifunctional protein has been reported to regulate the expression of many host genes aside from its role as a structural component of the virion [35, 36]. Furthermore, expression of HCV core protein alone is sufficient to alter the LD-associated proteome in various cell models [37, 38]. Interestingly,

HCV-induced changes in LD composition may involve different molecular mechanisms, including displacing of LD-associated proteins owing to the own localization of HCV core protein to LDs, as reported for adipose differentiation-related protein [39], and direct or indirect regulation of gene expression, as suggested here for LPCAT1.

In hepatic cells, an increased intracellular TAG content can result from increased fatty acid uptake, increased TAG synthesis, decreased fatty acid oxidation and/or decreased TAG-rich lipoprotein secretion. The latter mechanism cannot account for the increased TAG content observed in LPCAT1-depleted cells because the secretion of newly synthesized TAGs was slightly increased in these cells. Another mechanism is suggested by the localization of LPCAT1 to LDs. Like HCV core protein [39], LPCAT1 may displace LD-associated proteins involved in lipid metabolism by its mere presence at the LD surface. Furthermore, LPCAT1 is a PL-remodelling enzyme that catalyses the acylation of lysophosphatidylcholine into phosphatidylcholine [21, 40], the reverse reaction being performed by phospholipases A2 that may also be present at the LD surface [20]. Lysophosphatidylcholine and phosphatidylcholine have a different shape, and the alteration of the surface lipid composition may lead to changes in LD stability (e.g., LD fusion, LD interaction with membranes) and in protein binding [19]. Theoretically, LPCAT1 depletion should lead to an increased amount of lysophosphatidylcholine at the LD surface, a situation that does not favor LD fusion [19]. In fact, we observed fewer LDs of larger size, which may reflect LD fusion, in agreement with Moessinger et al. although the total TAG content was not measured in their studies [22, 23]. Nevertheless, the modification of the PL monolayer composition induced by LPCAT1 depletion probably initiates a reaction cascade that leads to impairment of protein interactions with the LD surface and further, possibly, with other organelles such as endoplasmic reticulum or mitochondria. Indeed, the trafficking of LD-associated proteins, including key enzymes of TAG metabolism, can be strongly modulated and the various mechanisms are only beginning to be understood as exemplified by recent reports [16, 41, 42].

Besides the association of HCV particles with TAG-rich lipoproteins, another clinical feature that links HCV infection with the host lipid metabolism is the high prevalence of liver steatosis, which is partly attributable to a direct viral effect [1, 43]. LPCAT1 depletion was shown here to cause both an increase in the net intracellular TAG content, i.e., steatosis, and an increase in the production of HCV particles associated with TAG-rich lipoproteins, thus illustrating a possible link between steatosis and LVP morphogenesis. However, a variety of mechanisms

have been suggested to account for HCV-induced steatosis, including inhibition of VLDL biogenesis which, unlike LPCAT1 downregulation, may explain the hypobetalipoproteinaemia frequently associated with liver steatosis in HCV-infected patients [1-3, 7, 43, 44]. Thus, HCV-induced steatosis may only partially be accounted for by LPCAT1 downregulation. Furthermore, it remains uncertain whether steatosis per se has a role in LVP morphogenesis. The occurrence of liver steatosis in HCV-infected patients may simply represent the net result of the sum of perturbations of the host lipid metabolism that HCV induces primarily for the benefit of viral replication and LVP production added to non-viral steatogenic mechanisms of metabolic origin that can coexist to varying degrees in the same individual.

Upon LPCAT1 depletion in Huh-7.5.1 cells we observed an increased secretion of both ApoB and newly synthesized TAGs, whereas a recent study reported a decreased secretion of both ApoB and lipids in LPCAT1-depleted Huh-7 cells [22]. This apparent discrepancy may be partly due to the different Huh-7 sublines but is more likely explained by the different experimental conditions used. As we previously showed that fatty acid addition activates the secretion of ApoB-containing lipoproteins in Huh-7 cell line [25], we supplemented cells with 0.6 mM oleic acid, which corresponds to a physiological concentration in the fasting state in humans. By contrast, Huh-7 cells were incubated with only trace amounts of radiolabelled fatty acids in the study by Moessinger et al. [22], and under these conditions the paucity of newly synthesized TAGs available for lipoprotein formation may have precluded ApoB lipidation in the endoplasmic reticulum, leading to decreased secretion of ApoB and lipids.

LVPs found both in the liver and in the circulating blood of HCV-infected patients contain ApoB, the non-exchangeable apolipoprotein essential for VLDL scaffolding [4, 5, 45]. LPCAT1 depletion is shown here to increase both the secretion of ApoB-containing lipoproteins and of HCV particles of lowest buoyant density. The presence of ApoB in the density range of the excess of HCV particles produced is compatible with their physical association but does not provide direct evidence for this hypothesis. The literature contains conflicting reports as to whether ApoB is incorporated into HCV particles produced from Huh-7 cells and is necessary for production of infectious virus [46-51]. One possible source of discrepancies between published data may be the intrinsic inability of Huh-7 cell line to fully lipidate ApoB and hence secrete genuine VLDLs [25, 30]. Our HCV culture system in PHH provides a more relevant model for readdressing these issues, yet the lower viral titres make it even more difficult to purify and characterize hybrid LVPs present within a large excess of non-

viral lipoproteins [6, 8, 25]. Nevertheless, our identification of LPCAT1 depletion as a single mechanism that increases both VLDL and LVP secretion suggests that HCV usurps at least some of the mechanisms of VLDL biogenesis for LVP morphogenesis, even if ApoB per se is not incorporated into HCV particles.

HCV is a leading cause of chronic liver disease ranging from steatosis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Treatment against HCV has entered a new era with the recent development of directly acting antivirals, yet these drugs have a prohibitive price, are intrinsically at risk for selection of resistant variants and may not cure a small proportion of hard-to-treat patients among whom those infected with genotype 3, the HCV genotype most clearly associated with virally induced steatosis [43, 52]. By contrast, host-targeting agents with anti-HCV activity are expected to confer a high barrier to drug resistance and a pan-genotypic coverage, and therefore may appear as a useful complement to virus-targeting agents in most difficult-to-treat patients [53]. The intimate link of HCV with the host lipid metabolism designates lipid-modulating agents as putative antivirals [3, 54]. Depending on their mechanism of action, however, a potential side effect of drugs in this therapeutic class may be to aggravate hepatic steatosis. With this in mind, targeting the LPCAT1-regulated lipid metabolism pathway in the opposite direction to that usurped by HCV may represent an attractive therapeutic approach because it is expected to reduce not only the viral titre but also hepatic steatosis.

Acknowledgements

We thank J. McLauchlan for the R308 antibody, R. Everett for silencing plasmids, F.V. Chisari for the Huh-7.5.1 cells and Cochin Imaging Facility for help with image analysis. Confocal microscopy was performed using the CICC facilities of UMR_S 1138.

References

- [1] Negro F. Abnormalities of lipid metabolism in hepatitis C virus infection. *Gut* 2010;59:1279-1287.
- [2] Syed GH, Amako Y, Siddiqui A. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:33-40.

- [3] Felmler DJ, Hafirassou ML, Lefevre M, Baumert TF, Schuster C. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. *Viruses* 2013;5:1292-1324.
- [4] Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 2002;76:6919-6928.
- [5] Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechockchai W, Toms GL. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* 2006;80:2418-2428.
- [6] Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, Andre P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 2011;19:95-103.
- [7] Filipe A, McLauchlan J. Hepatitis C virus and lipid droplets: finding a niche. *Trends Mol Med* 2015;21:34-42.
- [8] Lindenbach BD. Virion assembly and release. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;369:199-218.
- [9] Walther TC, Farese RV, Jr. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem* 2012;81:687-714.
- [10] Gibbons GF, Islam K, Pease RJ. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta* 2000;1483:37-57.
- [11] Olofsson SO, Bostrom P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Boren J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:448-458.
- [12] Fujimoto Y, Itabe H, Sakai J, Makita M, Noda J, Mori M, et al. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:47-59.
- [13] Mashek DG, Khan SA, Sathyanarayan A, Ploeger JM, Franklin MP. Hepatic lipid droplet biology: Getting to the root of fatty liver. *Hepatology* 2015.
- [14] Hodges BD, Wu CC. Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *J Lipid Res* 2010;51:262-273.
- [15] Yang L, Ding Y, Chen Y, Zhang S, Huo C, Wang Y, et al. The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans. *J Lipid Res* 2012;53:1245-1253.

- [16] Wilfling F, Thiam AR, Olarte MJ, Wang J, Beck R, Gould TJ, et al. Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *Elife* 2014;3:e01607.
- [17] Wilfling F, Wang H, Haas JT, Kraemer N, Gould TJ, Uchida A, et al. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets. *Dev Cell* 2013;24:384-399.
- [18] Sletten A, Seline A, Rudd A, Logsdon M, Listenberger LL. Surface features of the lipid droplet mediate perilipin 2 localization. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;452:422-427.
- [19] Thiam AR, Farese RV, Jr., Walther TC. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:775-786.
- [20] Penno A, Hackenbroich G, Thiele C. Phospholipids and lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831:589-594.
- [21] Hishikawa D, Hashidate T, Shimizu T, Shindou H. Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J Lipid Res* 2014;55:799-807.
- [22] Moessinger C, Klizaitė K, Steinhagen A, Philippou-Massier J, Shevchenko A, Hoch M, et al. Two different pathways of phosphatidylcholine synthesis, the Kennedy Pathway and the Lands Cycle, differentially regulate cellular triacylglycerol storage. *BMC Cell Biol* 2014;15:43.
- [23] Moessinger C, Kuerschner L, Spandl J, Shevchenko A, Thiele C. Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine. *J Biol Chem* 2011;286:21330-21339.
- [24] Pene V, Hernandez C, Vauloup-Fellous C, Garaud-Aunis J, Rosenberg AR. Sequential processing of hepatitis C virus core protein by host cell signal peptidase and signal peptide peptidase: a reassessment. *J Viral Hepat* 2009;16:705-715.
- [25] Podevin P, Carpentier A, Pene V, Aoudjehane L, Carriere M, Zaidi S, et al. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* 2010;139:1355-1364.
- [26] Carriere M, Pene V, Breiman A, Conti F, Chouzenoux S, Meurs E, et al. A novel, sensitive, and specific RT-PCR technique for quantitation of hepatitis C virus replication. *J Med Virol* 2007;79:155-160.
- [27] Chateau D, Pauquai T, Delers F, Rousset M, Chambaz J, Demignot S. Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol* 2005;202:767-776.

- [28] Zhao Y, Chen YQ, Bonacci TM, Brecht DS, Li S, Bensch WR, et al. Identification and characterization of a major liver lysophosphatidylcholine acyltransferase. *J Biol Chem* 2008;283:8258-8265.
- [29] Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3805-3809.
- [30] Meex SJ, Andreo U, Sparks JD, Fisher EA. Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? *J Lipid Res* 2011;52:152-158.
- [31] Blackham S, Baillie A, Al-Hababi F, Remlinger K, You S, Hamatake R, et al. Gene expression profiling indicates the roles of host oxidative stress, apoptosis, lipid metabolism, and intracellular transport genes in the replication of hepatitis C virus. *J Virol* 2010;84:5404-5414.
- [32] Colman H, Le Berre-Scoul C, Hernandez C, Pierredon S, Bihouee A, Houlgatte R, et al. Genome-wide analysis of host mRNA translation during hepatitis C virus infection. *J Virol* 2013;87:6668-6677.
- [33] Diamond DL, Syder AJ, Jacobs JM, Sorensen CM, Walters KA, Proll SC, et al. Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000719.
- [34] Liu X, Wang T, Wakita T, Yang W. Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells. *Virology* 2010;398:57-67.
- [35] Khan M, Jahan S, Khaliq S, Ijaz B, Ahmad W, Samreen B, et al. Interaction of the hepatitis C virus (HCV) core with cellular genes in the development of HCV-induced steatosis. *Arch Virol* 2010;155:1735-1753.
- [36] McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 2000;7:2-14.
- [37] Beilstein F, Bouchoux J, Rousset M, Demignot S. Proteomic analysis of lipid droplets from Caco-2/TC7 enterocytes identifies novel modulators of lipid secretion. *PLoS one* 2013;8:e53017.
- [38] Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Natsume T, Suzuki T, Shoji I, et al. Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *J Biochem* 2006;139:921-930.

- [39] Boulant S, Douglas MW, Moody L, Budkowska A, Targett-Adams P, McLauchlan J. Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic* 2008;9:1268-1282.
- [40] Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, Eto M, Shimizu T. Generation of membrane diversity by lysophospholipid acyltransferases. *J Biochem* 2013;154:21-28.
- [41] Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase--new roles for an old enzyme. *Biochem J* 2004;379:11-22.
- [42] Suzuki M, Murakami T, Cheng J, Kano H, Fukata M, Fujimoto T. ELMOD2 is anchored to lipid droplets by palmitoylation and regulates adipocyte triglyceride lipase recruitment. *Mol Biol Cell* 2015;26:2333-2342.
- [43] Goossens N, Negro F. Is genotype 3 of the hepatitis C virus the new villain? *Hepatology* 2014;59:2403-2412.
- [44] Serfaty L, Andreani T, Giral P, Carbonell N, Chazouilleres O, Poupon R. Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:428-434.
- [45] Nielsen SU, Bassendine MF, Martin C, Lowther D, Purcell PJ, King BJ, et al. Characterization of hepatitis C RNA-containing particles from human liver by density and size. *J Gen Virol* 2008;89:2507-2517.
- [46] Boyer A, Dumans A, Beaumont E, Etienne L, Roingard P, Meunier JC. The association of hepatitis C virus glycoproteins with apolipoproteins E and B early in assembly is conserved in lipoviral particles. *J Biol Chem* 2014;289:18904-18913.
- [47] Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:9505-9510.
- [48] Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 2008;82:2120-2129.
- [49] Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Jr., et al. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:5848-5853.
- [50] Jiang J, Luo G. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* 2009;83:12680-12691.
- [51] Merz A, Long G, Hiet MS, Brugger B, Chlanda P, Andre P, et al. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem* 2011;286:3018-3032.

- [52] Pawlotsky JM, Feld JJ, Zeuzem S, Hoofnagle JH. From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure. *J Hepatol* 2015;62:S87-99.
- [53] Baugh JM, Garcia-Rivera JA, Gallay PA. Host-targeting agents in the treatment of hepatitis C: a beginning and an end? *Antiviral Res* 2013;100:555-561.
- [54] Bassendine MF, Sheridan DA, Felmlee DJ, Bridge SH, Toms GL, Neely RD. HCV and the hepatic lipid pathway as a potential treatment target. *J Hepatol* 2011;55:1428-1440.

Figures:

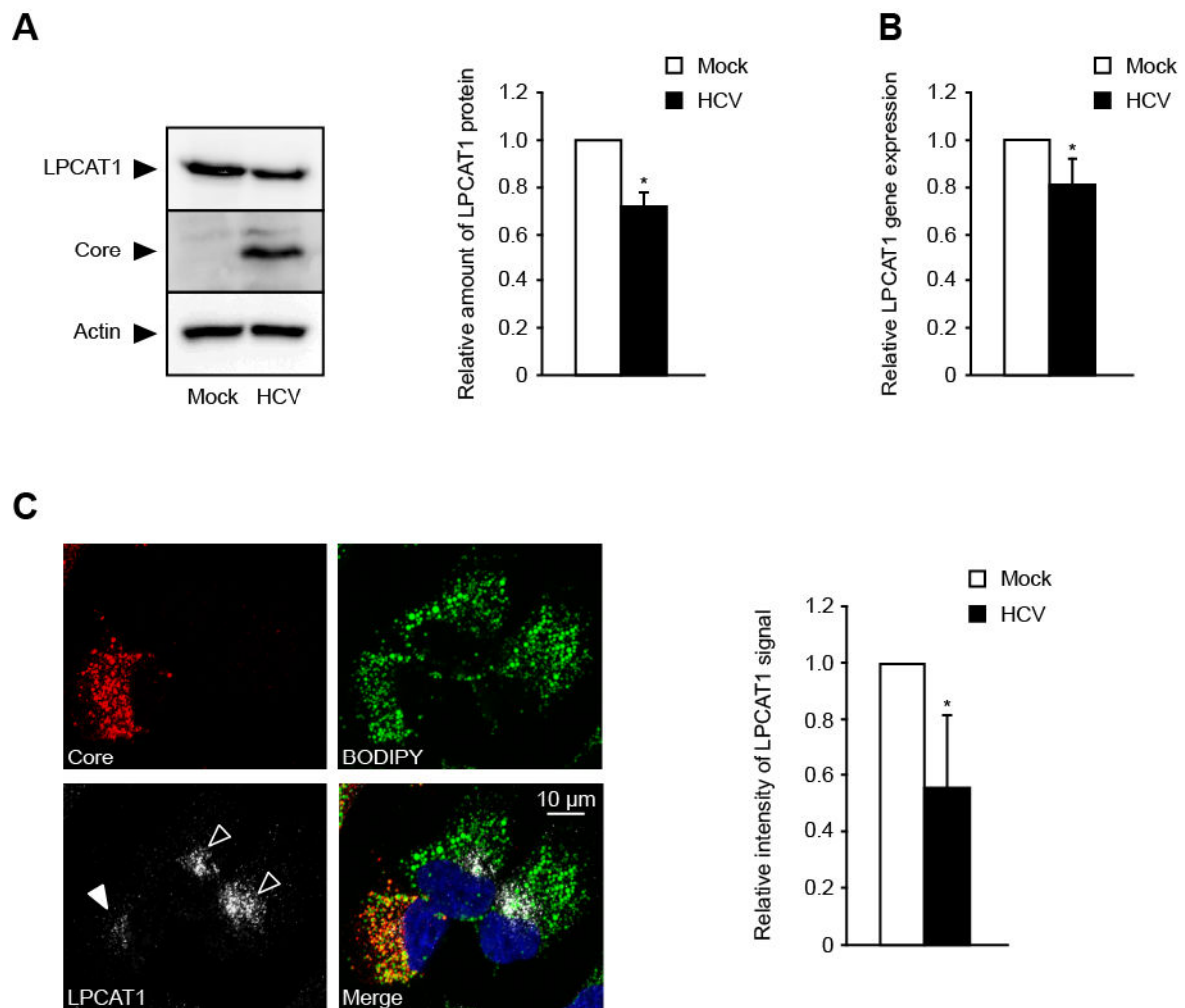


Fig. 1. HCV infection downregulates LPCAT1 in Huh-7.5.1 cells. Cells were inoculated or not with HCV. Three days later, cells were lysed for (A) western blot and (B) RT-qPCR analyses. (C) Cells were incubated with oleic acid/BSA for the last 24 h of culture, then stained for LPCAT1 (white), HCV core protein (red), LDs (green) and nucleus (blue), and the LPCAT1 signals were quantified (right); in the HCV-inoculated cell population (left), white and empty arrowheads indicate infected and non-infected cells, respectively.

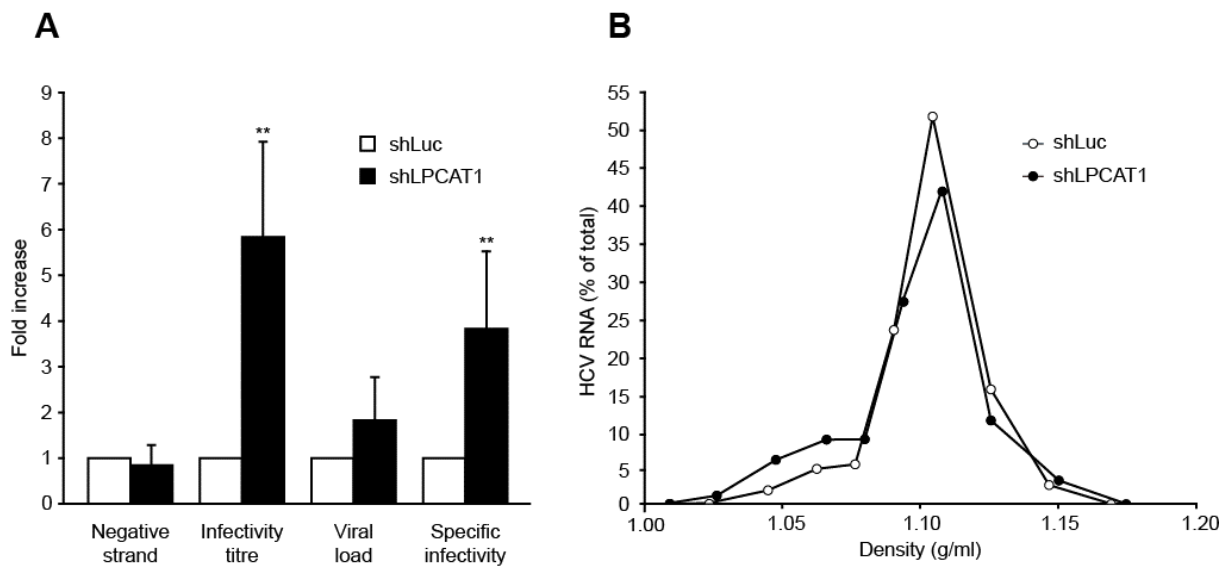


Fig. 2. LPCAT1 depletion in Huh-7.5.1 cells increases production of HCV particles with high specific infectivity and low density. Cells were transduced with lentiviral vectors coding shLuc or shLPCAT1, then inoculated with HCV. (A) Cells were lysed 1 day post-inoculation for quantification of negative-strand HCV RNA and culture supernatants were collected 3 days post-inoculation for determination of infectivity titre and viral load, then calculation of specific infectivity. (B) Culture supernatants were subjected to isopycnic iodixanol gradient ultracentrifugation. HCV RNA amounts expressed as percentages of total in the gradient are plotted against buoyant density.

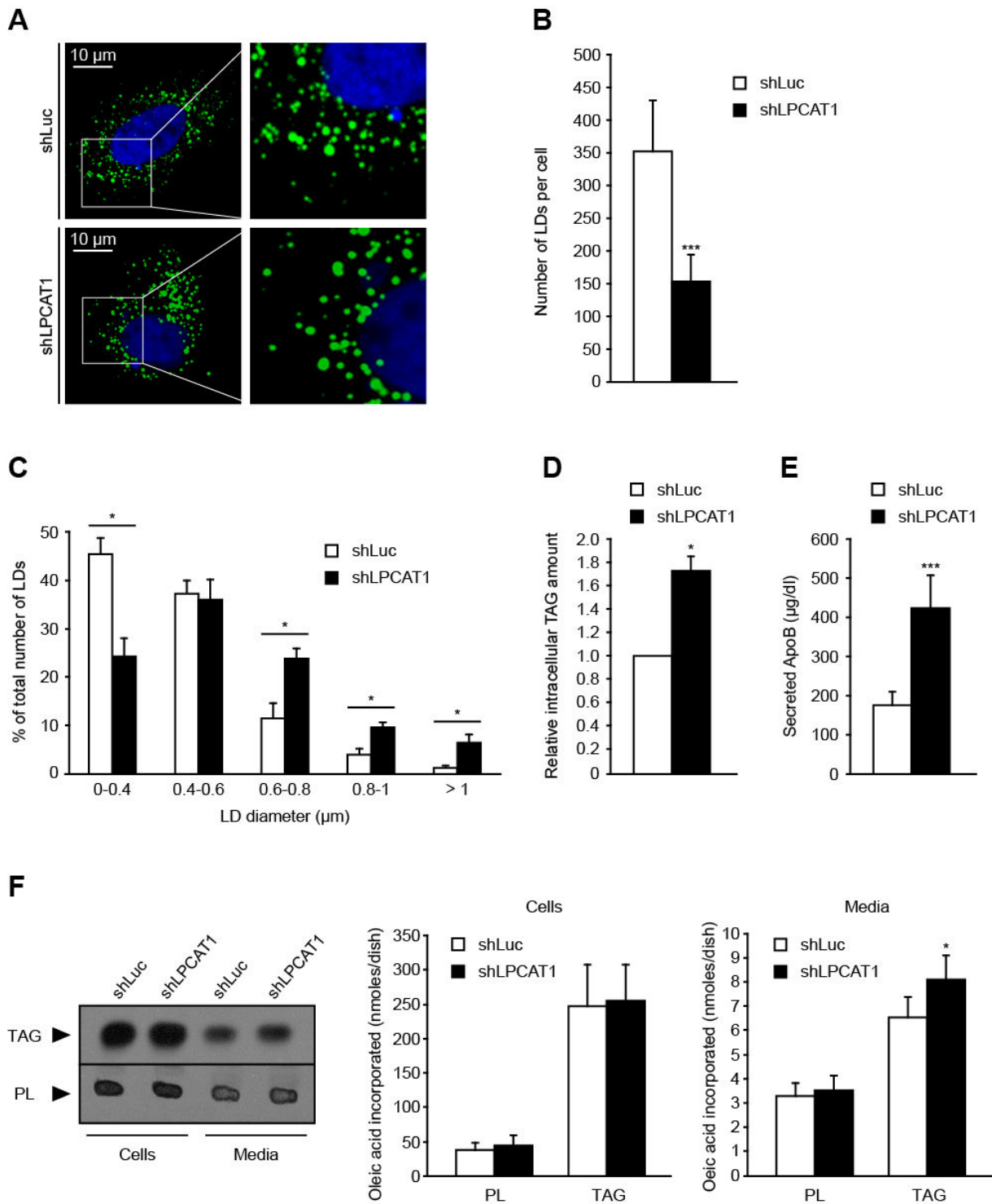


Fig. 3. LPCAT1 depletion in Huh-7.5.1 cells alters lipid metabolism. Cells were transduced with lentiviral vectors coding shLuc or shLPCAT1. Three days later, (A) cells were stained for LDs (green) and nucleus (blue); LDs were (B) counted and (C) analysed for size distribution; (D) intracellular TAG content and (E) secreted ApoB were quantified. (F) Cells were cultured for 24 h with oleic acid/BSA containing [1-¹⁴C] oleic acid, then TAGs and PLs from cells and media were fractionated and radioactivity was quantified.

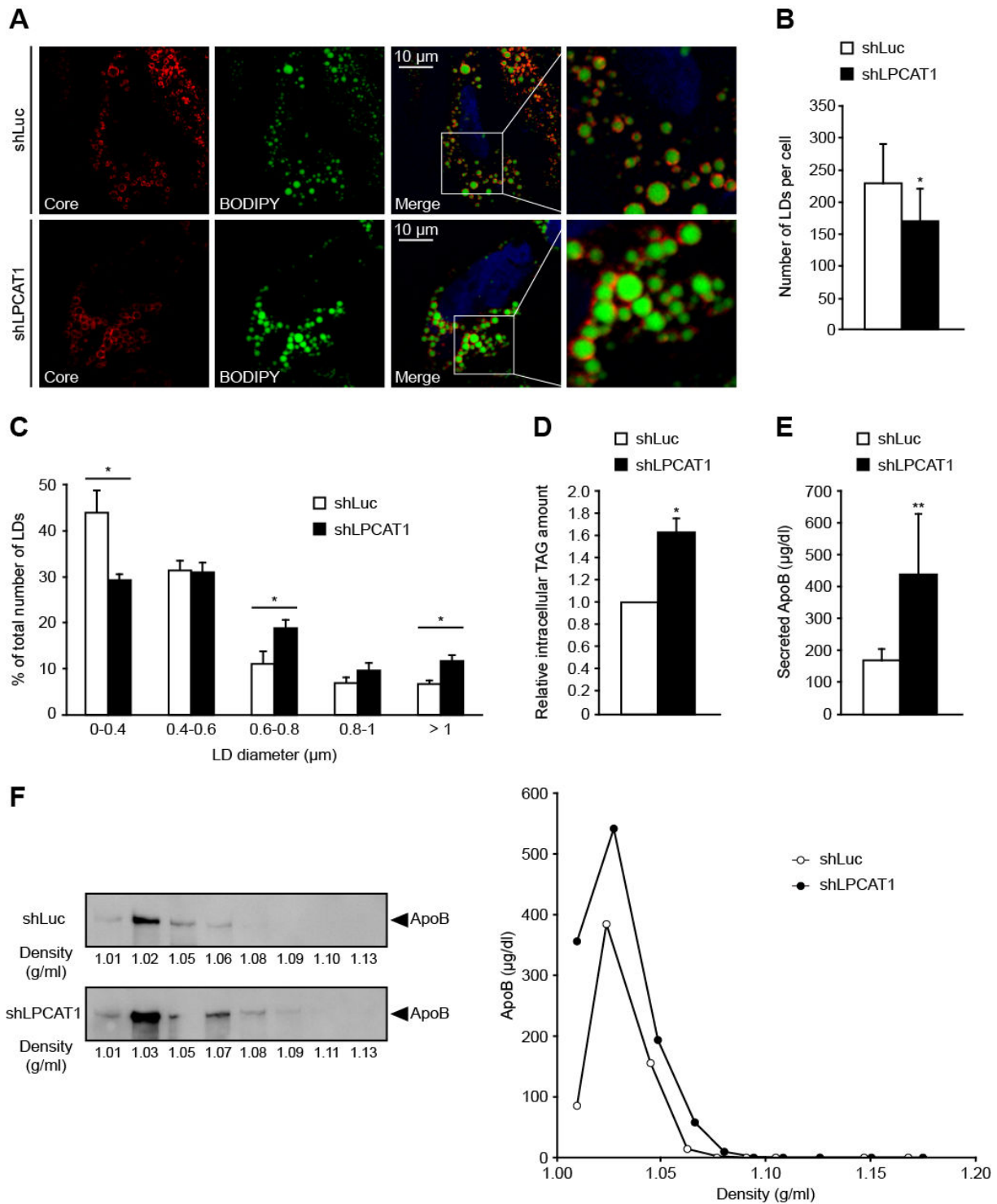


Fig. 4. LPCAT1 depletion in HCV-infected Huh-7.5.1 cells alters lipid metabolism. Cells were transduced with lentiviral vectors coding shLuc or shLPCAT1, then inoculated with HCV. Three days post-inoculation, (A) cells were stained for HCV core protein (red) and LDs (green); LDs were (B) counted and (C) analysed for size distribution; (D) intracellular TAG content and (E) secreted ApoB were quantified. (F) Culture supernatants were subjected to isopycnic iodixanol gradient ultracentrifugation, and fractions were analysed for ApoB by western blot (left) and ELISA (right).

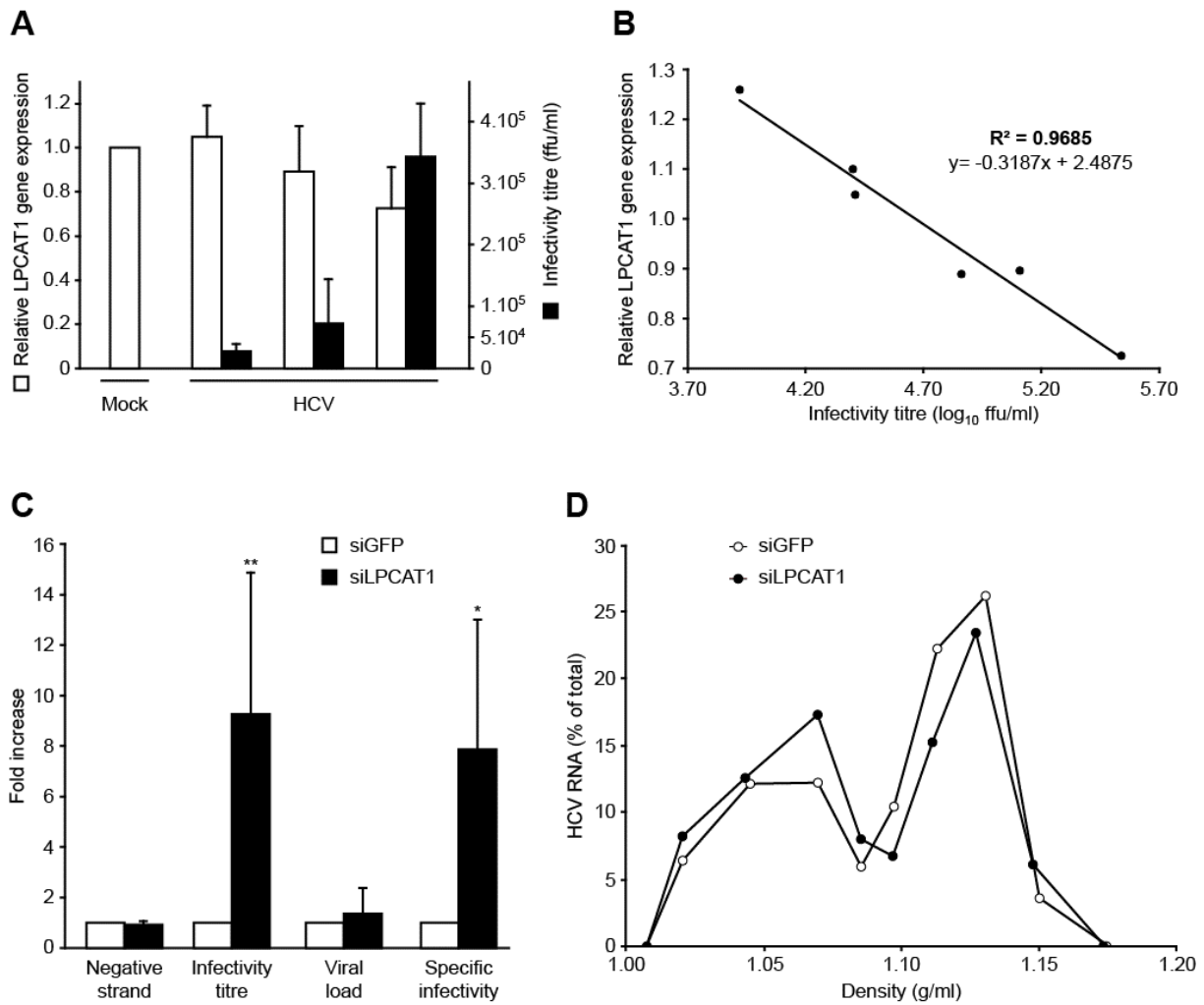


Fig. 5. HCV infection downregulates LPCAT1 in PHH and LPCAT1 depletion in these cells increases production of HCV particles with high specific infectivity and low density. (A and B) PHH were inoculated or not with HCV, and analysed 6 days later for LPCAT1 mRNA amounts and infectivity titres; (B) linear regression between these two variables. (C and D) PHH were transfected with siGFP or siLPCAT1, then inoculated with HCV: (C) same legend as Fig. 2A, (D) same legend as Fig. 2B.

Supplementary data to:

Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 is downregulated by hepatitis C virus: impact on production of lipo-viro-particles

Frauke Beilstein^{1,2,†}, Matthieu Lemasson^{3,†}, Véronique Pène³,
Arielle R. Rosenberg^{3,4,‡}, Sylvie Demignot^{1,2,‡}

¹*Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR_S 1138, Centre de recherche des Cordeliers, Paris, France;* ²*EPHE, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, Paris, France;* ³*Université Paris Descartes, EA 4474 « Virologie de l'Hépatite C », Paris, France;* ⁴*AP-HP, Groupe Hospitalier Cochin, Service de Virologie, Paris, France*

† or ‡ These authors contributed equally to this work.

Contents

Supplementary Materials and Methods	133
<i>Antibodies</i>	<i>133</i>
<i>Cell culture</i>	<i>133</i>
<i>HCV infection</i>	<i>134</i>
<i>Gene silencing</i>	<i>134</i>
<i>RT-qPCR</i>	<i>134</i>
<i>Western blotting</i>	<i>135</i>
<i>Confocal microscopy</i>	<i>135</i>
<i>ApoB quantification</i>	<i>136</i>
<i>Lipid analyses</i>	<i>136</i>
<i>Cytotoxicity assay</i>	<i>136</i>
Supplementary Figures	137
Supplementary Fig. 1. Efficiency of LPCAT1 silencing.	137
Supplementary Fig. 2. Absence of cytotoxicity upon LPCAT1 depletion.	138
Supplementary References	139

Supplementary Materials and Methods

Antibodies

The antibodies against LPCAT1 (HPA022268) and actin (A3853) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and the anti-HCV core protein monoclonal antibody (C7-50) used for confocal microscopy was from Abcam (Cambridge, UK). The anti-HCV core protein antibody (R308) used for western blots was generously provided by J. McLauchlan [1] and the monoclonal antibody against human ApoB (1D1) was from the Heart Institute of the University of Ottawa, Canada. Secondary antibodies were appropriate Alexa Fluor 568- and 633-conjugated antibodies and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated IgGs (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK).

Cell culture

HEK 293T cells were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Life technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS, GE Healthcare).

Huh-7.5.1 cells (a kind gift from F.V. Chisari, the Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) were grown in DMEM supplemented with 10 mM hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer (pH 7.3), 1% non-essential amino acids, 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin (all Life technologies) and 10% heat-inactivated FCS, at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Where indicated, cells were incubated with 0.6 mM oleic acid in complex with BSA for the last 24 h of culture to promote LD formation. For this, oleic acid (6 µl from a 100 mM stock solution in chloroform/methanol 2:1 (v/v) per ml of final medium to prepare) was dried under a stream of nitrogen, then incubated with FCS (0.2 ml per ml of final medium to prepare) for 1 h at 37 °C to obtain oleic acid in complex with BSA. The mixture was adjusted to 1 ml with culture medium without serum and supplied to the cells. In some experiments, oleic acid/BSA was supplemented with 1 µCi [1-¹⁴C] oleic acid (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, MA, USA) per ml of final medium, as previously described [2].

PHH freshly isolated from HCV-seronegative adult patients were purchased from Biopredic (Rennes, France) and maintained in primary culture as described previously [3]. Briefly, PHH were resuspended in complete medium consisting of Leibovitz's L-15 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 26 mM NaHCO₃, 100 µg/ml streptomycin, 100

U/ml penicillin, 100 IU/l insulin (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) and 10% heat-inactivated FCS, and seeded onto 6-well plates pre-coated with calf skin type I collagen (Sigma-Aldrich) at a density of 1.6×10^5 viable cells/cm². The medium was replaced 16 h later with fresh complete medium supplemented with 1 μ M hydrocortisone hemisuccinate (SERB, Paris, France), and cells were left in this medium until HCV inoculation or siRNA transfection. The cultures were maintained in complete medium at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

HCV infection

A high-titre stock of JFH1-HCV [4] was produced as described previously [3]. Huh-7.5.1 cells and PHH were inoculated at a multiplicity of infection of 0.2 and 2 ffu per cell, respectively. The culture medium was replaced with the inoculum diluted in the smallest volume of fresh medium sufficient for covering the cells. The inoculum was removed after a 4-hour incubation at 37°C. Cells were washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS) and maintained in culture for the indicated times post-inoculation.

Gene silencing

The use of lentiviral vectors expressing small hairpin RNA (shRNA) was described previously [5]. Briefly, HEK 293T cells were co-transfected with three plasmids: pVSV-G, pCMVDR8.91 (provided by D. Trono [<http://ww1.tronolab.com/>]) and the shRNA-coding plasmid based on pLKO.1puro (the 19-nucleotide sequences used for silencing LPCAT1 and luciferase were GGAAGATCACATTCGCTGA and GTGCGTTGCTAGTACCAAC, respectively). The culture supernatant containing recombinant lentivirus was harvested 3 days post-transfection and used to transduce Huh-7.5.1 cells in the presence of hexadimethrine bromide (5 μ g/ml polybrene, Sigma-Aldrich). After overnight incubation, the cells were placed in selective medium containing 2 μ g/ml puromycin (Sigma-Aldrich) for 1 day, then culture supernatant was changed for fresh selective medium and cells were incubated 1 additional day. Finally, culture supernatant was replaced by complete medium and the next day cells were inoculated or not with HCV.

RT-qPCR

Total RNA was isolated from cells using TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA), according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed with 1 μ g of total RNA in a total volume of 20 μ l. PCR reactions were performed in quadruplicate

using a Light-cycler instrument (Roche, Basel, Switzerland). For each reaction, a 1:400 final dilution of the reverse transcription product was used with 0.4 μ M (final concentration) of each primer in SYBR Green I master mixture (Roche). PCR conditions were one step of denaturation (8 min at 95 °C) followed by 45 cycles (each cycle consisting of 10 s at 95 °C, 10 s at 60 °C and 10 s at 72 °C). Expression of LPCAT1 or LPCAT3 transcripts was normalized to that of human ribosomal protein L19 transcript. The following oligonucleotide primers were used (for each couple, the forward primer is listed first and the reverse primer second): L19 (AAGATCGATCGCCACATGTAT / TGC GTGCTTCCTTGGTCTTAG), LPCAT1 (CGATGTCCTCCATCGTGA / GGCCGTATATACTGGATCAGAGTT) and LPCAT3 (CGATGTCCTCCATCGTGA / GGCCGTATATACTGGATCAGAGTT).

Western blotting

Proteins were resolved on 10% (5% for ApoB) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membrane (Hybond ECL, GE Healthcare). Blots were blocked for 30 min with 5% skimmed milk in TBS-Tween consisting of 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl and 0.1% Tween 20, then probed with primary antibodies diluted in TBS-Tween containing 1% skimmed milk followed by appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies. Actin was used as a loading control. Blots were developed by enhanced chemiluminescence using ECL reagent (GE Healthcare). Bands were visualized using the Image Reader LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) and quantified using ImageJ software.

Confocal microscopy

Cells on glass coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature and, after two washes with PBS, permeabilized with 0.03% saponin in PBS for 30 min. After incubation with antibodies against LPCAT1 and/or HCV core protein (C7-50) for 1 h at room temperature, the coverslips were washed three times with PBS and incubated with appropriate secondary antibodies (Alexa Fluor 568–conjugated anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 633–conjugated anti-mouse IgG, respectively) for an additional hour. After three washes with PBS, cells were stained for neutral lipids by a 10-min incubation with 10 μ g/ml BODIPY 493/503 (Life Technologies) to visualise LDs and mounted in Fluoprep (BioMérieux, Marcy l’Etoile, France) containing 1 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich). The samples were examined using a Zeiss LSM 710 Meta confocal microscope. ImageJ software was used for quantification of signal intensity and for measurement of LD

number and size, using data from three independent experiments and at least 10 different pictures per condition.

ApoB quantification

ApoB levels in filtered culture supernatants or iodixanol gradient fractions were quantified by using the total human ApoB ELISA assay from ALerCHEK (Springvale, MA, USA), according to the manufacturer's instructions.

Lipid analyses

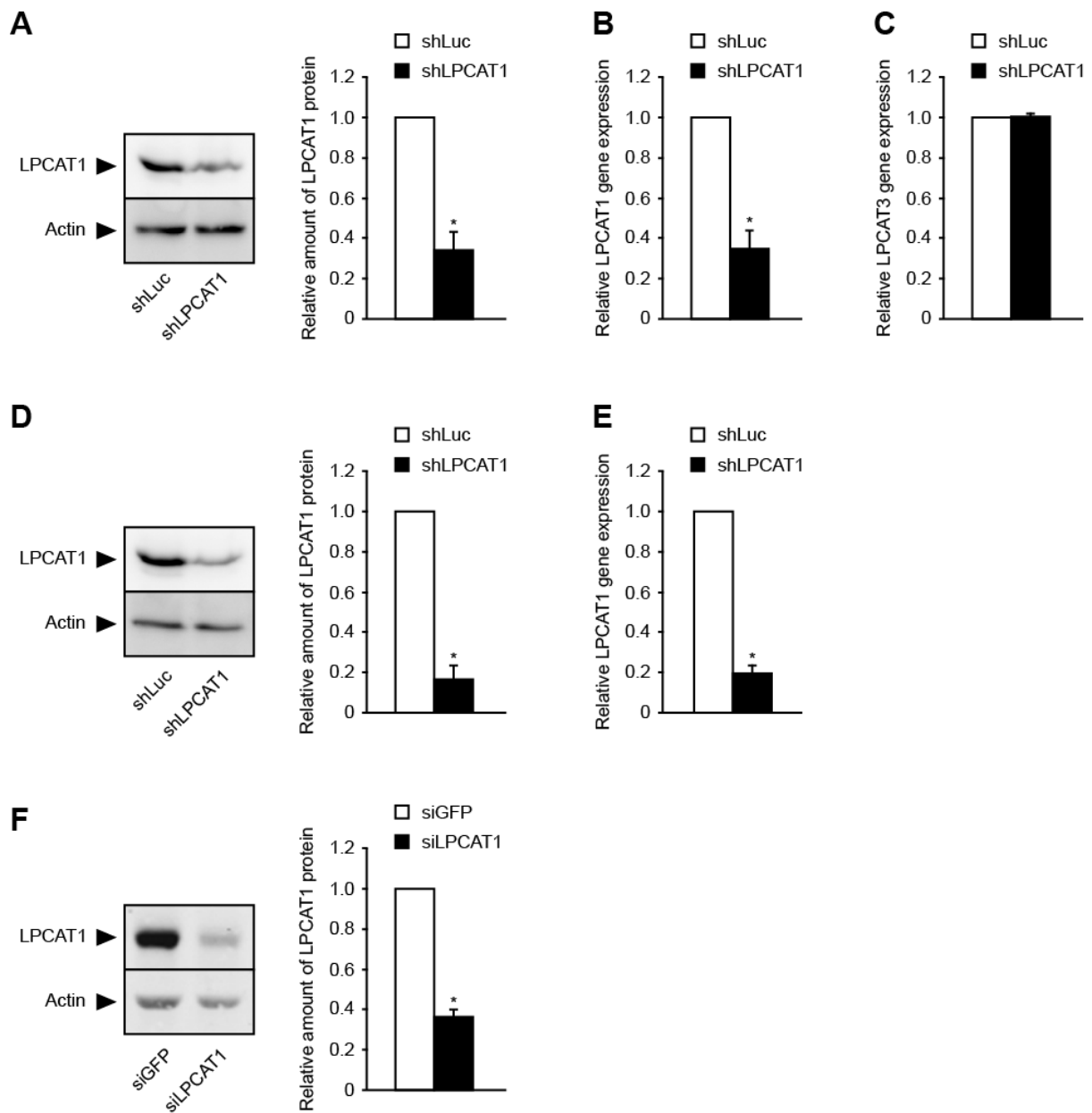
Quantification of the TAG mass was done using the PAP150TG kit (BioMérieux) according to the manufacturer's instructions with the following modifications. After solvent evaporation, 0.5 ml of the buffer provided with the kit was added to the dried lipids and tubes were sonicated for 10 s in a water bath sonicator. Then 0.5 ml of the 2-fold concentrated kit reagent was added and absorbance was measured after a 1-h incubation at 37°C.

The analysis of lipid secretion was performed using cells incubated with oleic acid/BSA containing 1µCi/ml [1-¹⁴C] oleic acid. After extraction, lipids from cells and media were fractionated by thin layer chromatography (TLC) as described previously [2]. The radioactive bands of the TLC plates were excised and the radioactivity was quantified by liquid-scintillation counting to evaluate the incorporation of [1-¹⁴C] oleic acid into lipids. For normalization, protein concentration of cell lysates was measured using the BC Assay (Interchim, Montluçon, France), according to the manufacturer's instructions.

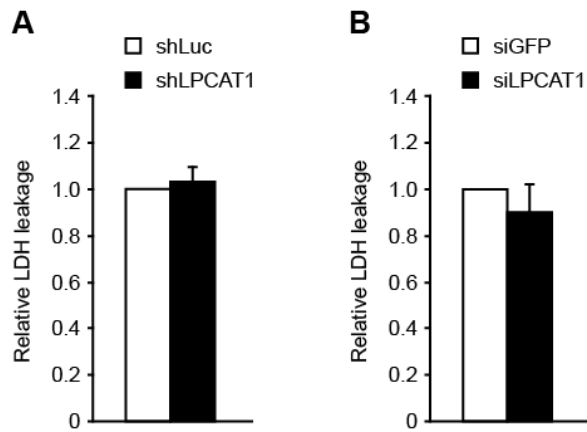
Cytotoxicity assay

To assess the potential cytotoxicity of LPCAT1 silencing, the activity of lactate dehydrogenase released into culture supernatants was measured in triplicate using the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI, USA), according to the recommendations of the manufacturer.

Supplementary Figures



Supplementary Fig. 1. Efficiency of LPCAT1 silencing. (A-E) Huh-7.5.1 cells were transduced with lentiviral vectors coding shLuc or shLPCAT1, then (D-E) inoculated with HCV or (A-C) left naïve. (F) PHH were transfected with siGFP or siLPCAT1, then inoculated with HCV. Three days post-inoculation, cells were lysed for (A, D and F) western blot and (B, C and E) RT-qPCR analyses.



Supplementary Fig. 2. Absence of cytotoxicity upon LPCAT1 depletion. (A) Huh-7.5.1 cells were transduced with lentiviral vectors coding shLuc or shLPCAT1, or (B) PHH were transfected with siGFP or siLPCAT1, then inoculated with HCV. Three days post-inoculation, culture supernatants were collected to measure lactate dehydrogenase (LDH) leakage.

Supplementary References

- [1] Targett-Adams P, Chambers D, Gledhill S, Hope RG, Coy JF, Girod A, et al. Live cell analysis and targeting of the lipid droplet-binding adipocyte differentiation-related protein. *J Biol Chem* 2003;278:15998-16007.
- [2] Chateau D, Pauquai T, Delers F, Rousset M, Chambaz J, Demignot S. Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol* 2005;202:767-776.
- [3] Podevin P, Carpentier A, Pene V, Aoudjehane L, Carriere M, Zaidi S, et al. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* 2010;139:1355-1364.
- [4] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-796.
- [5] Everett RD, Rechter S, Papior P, Tavalai N, Stamminger T, Orr A. PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J Virol* 2006;80:7995-8005.

Discussion

Des études transcriptomiques en lignée Huh-7 infectée par la souche JFH1 ont révélé que le VHC modifiait le transcriptome de la cellule, dont certains gènes impliqués dans le métabolisme lipidique comme SREBP-1 ou encore PPAR- α (Kapadia SB and Chisari FV, 2005; Blackham S *et al.*, 2010; Diamond DL *et al.*, 2010; Liu X *et al.*, 2010; Colman H *et al.*, 2013). Cependant, aucune n'a permis l'identification de LPCAT1 auparavant. En revanche LPCAT1 a été décrite comme surexprimée dans plusieurs cancers, où elle participe à leur évolution et à leur prolifération (Mansilla F *et al.*, 2009; Morita Y *et al.*, 2013; Uehara T *et al.*, 2015). Dans cette étude, nous montrons que les cellules Huh-7.5.1 inoculées avec la souche JFH1 du VHC présentent une diminution du niveau d'expression à la fois de la protéine LPCAT1 et de son transcrite, indiquant une régulation s'exerçant probablement au niveau transcriptionnel et peut-être aussi en aval. L'autofluorescence notable des HHP empêche toute approche de marquage *in situ* par immunofluorescence. Aussi, nous supposons que les HHP présentent un taux de cellules infectées moindre que celui observé en lignée cellulaire, compte tenu du niveau plus faible des titres infectieux détectés en HHP. Si ce modèle n'est donc pas le plus indiqué pour ce genre d'analyses, la très bonne corrélation observée entre le niveau d'infection et la diminution de la quantité du transcrite de LPCAT1 est d'autant plus pertinente. De façon intéressante, il est démontré que l'expression de LPCAT3, exprimée dans les hépatocytes comme LPCAT1, est régulée par PPAR- α et le LXR, et induite lors de la lipogenèse (Demeure O *et al.*, 2011; Eto M *et al.*, 2012). Malgré les modulations par le VHC décrites pour ces deux régulateurs, nous n'avons pas observé de variation de la quantité du transcrite de LPCAT3, lors de l'infection en cellules Huh-7.5.1 (Supp. Fig.1C). L'expression de LPCAT1 pourrait également être régulée par SREBP-1 et/ou PPAR- α , et donc par le VHC, mais ni l'examen de sa séquence ni la littérature ne nous ont permis d'étayer cette hypothèse. Il n'est pas exclu que la protéine C du VHC soit à la base de cette sous-expression, étant déjà décrite dans la régulation de nombreux gènes de la cellule hôte (Blackham S *et al.*, 2010; Diamond DL *et al.*, 2010; Liu X *et al.*, 2010; Colman H *et al.*, 2013). De plus la protéine C est localisée aux GLCs comme LPCAT1, et pourrait à ce titre exercer une régulation post-traductionnelle de LPCAT1 indépendamment de la régulation au niveau transcriptionnel. Comme par exemple la perte de localisation de PLIN2 à la surface des GLCs, induite par la protéine C

(Boulant S *et al.*, 2008). Les mécanismes impliqués dans la régulation de LPCAT1 par le VHC requièrent donc une étude approfondie.

Nous avons confirmé par immunofluorescence *in situ* la double localisation de LPCAT1 décrite en Huh-7.5.1 au niveau du RE, ainsi qu'à la surface des GLCs (Moessinger C *et al.*, 2011). Cette seconde localisation était inattendue du fait de la présence d'un motif KKXX de rétention au RE mais serait due à l'éloignement de ce motif porté par la partie C-terminale de LPCAT1 (Shikano S and Li M, 2003). Une autre possibilité ferait intervenir le modèle de « bourgeonnement » vésiculaire (**Figure 4**), où la protéine enchâssée dans la membrane serait directement incorporée lors du « bourgeonnement » de la GLC. Nous avons observé une diminution du nombre de GLCs couplée à l'augmentation de leur taille moyenne lors de l'extinction de LPCAT1. Ces résultats peuvent s'expliquer soit par une fusion des GLCs entre elles, soit par une production moins élevée de GLCs à la membrane du RE mais avec un enrichissement supérieur en lipides. Ces deux hypothèses ne sont pas

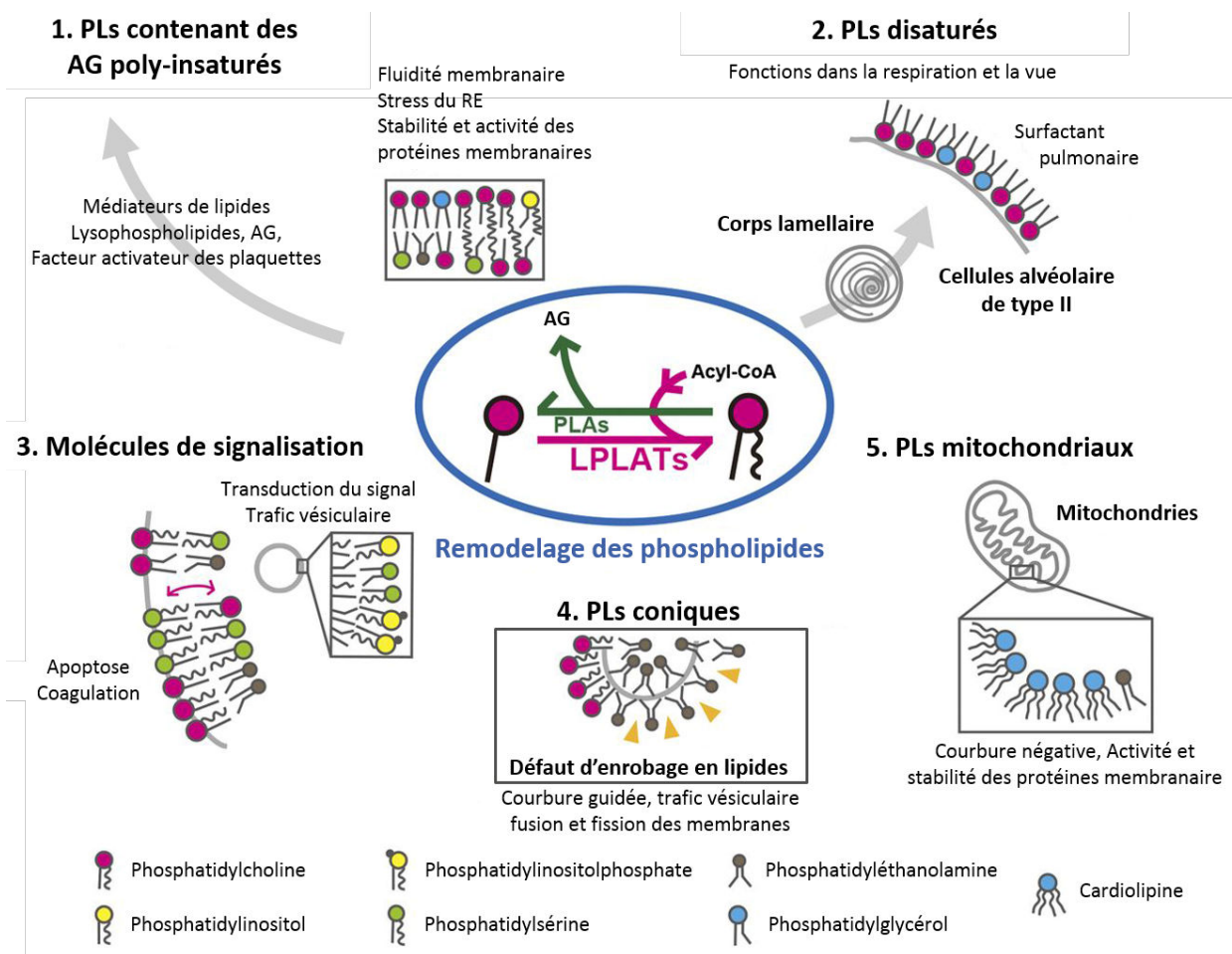


Figure 27 : Impacts du remodelage et de la diversité des PLs membranaires d'après (Hishikawa D *et al.*, 2014)

mutuellement exclusives, et dans les deux cas induites par la modification de la composition des membranes en PLs (**Figure 27.4.**).

En effet, la PC est le constituant majoritaire des membranes et l'inhibition de LPCAT1 contribue à augmenter la diversité membranaire par l'action de PLA2. Les PLs voyant ainsi leur second groupement acyl hydrolysé pourront soit (1) contribuer à la synthèse de nouvelles PCs, dont la longueur de la seconde chaîne d'AG sera différente car catalysée par une autre enzyme (**Figure 27.1.**), soit (2) participer à la synthèse d'autres espèces de PLs (**Figure 27.4.**). Cette diversité permet d'augmenter la fluidité, la courbure et la fusion des membranes, mais favorise également le trafic vésiculaire et la stabilité / l'activité des protéines associées à ces membranes (Thiam AR *et al.*, 2013; Hishikawa D *et al.*, 2014). Ce sont donc autant de modifications qui peuvent survenir au niveau des GLCs mais aussi au niveau du RE, du fait de l'extinction de LPCAT1. L'association des complexes SNAREs ou CIDEB aux membranes des GLCs pourrait ainsi être facilitée, entraînant une fusion des GLCs plus fréquente. A ce propos, Wilfling *et al.* suggèrent qu'un déficit en PC et/ou une accumulation d'AP sont essentiels à la fusion des GLCs (Wilfling F *et al.*, 2013). D'autre part, la fixation et/ou l'activité des protéines impliquées dans la genèse des GLCs, comme par exemple DGAT1 ou la MTP, pourraient être favorisée(s), intensifiant la synthèse et l'enrichissement des GLCs en TAGs. En effet, l'extinction de LPCAT3 chez la souris promeut l'expression hépatique de la MTP, augmentant ainsi la sécrétion de VLDLs qui corrèle avec la concentration intracellulaire de lysophosphatidylcholines (Li Z *et al.*, 2012). De façon surprenante, les auteurs décrivent également une diminution intracellulaire de TAGs lors de l'extinction de LPCAT3, mais celle-ci pourrait être expliquée par l'augmentation de leur sécrétion *via* l'enrichissement des VLDLs. Une autre possibilité permettant d'expliquer l'augmentation de TAGs intracellulaires serait le recyclage des PCs hydrolysées par PLA2 et d'autres phospholipases, aux GLCs (Penno A *et al.*, 2013). La glycérophosphocholine et les deux chaînes d'AG résultantes seraient réutilisées dans la voie de Kennedy afin de synthétiser des TAGs. Par analogie, LPCAT1 pourrait présenter les mêmes fonctions que LPCAT3, cependant aucune étude ne le démontre actuellement. Une augmentation intracellulaire de TAGs peut naturellement survenir lors d'une absorption plus élevée ou d'une sécrétion réduite de lipides. Ces deux hypothèses sont infirmées par les expériences de suivi d'incorporation et de sécrétion d'acide oléique radioactif (Fig.3F), où aucune variation dans l'incorporation de lipides n'a

été observée, mais où leur sécrétion est significativement augmentée lors de l'extinction de LPCAT1.

Nous avons vu que les lipides membranaires du MW sont des acteurs importants dans la réplication virale car la modification de la composition des PLs membranaires peut influencer cette étape virale (Li Z et al., 2006). Or, l'extinction de LPCAT1 n'affectait pas la réplication virale proprement dite, laissant penser que LPCAT1 n'est pas localisée au MW, ou que la PC n'a aucun impact dans cette étape virale. En revanche, l'augmentation d'infectiosité spécifique des particules virales démontrait clairement un impact dans la morphogénèse virale. Nous supposons que ce gain d'infectiosité est dû à l'enrichissement des particules en TAGs, car la proportion des particules virales de faible densité était plus élevée lors de l'extinction de LPCAT1. La mobilisation de l'excès de TAGs contenus dans les GLCs peut s'effectuer par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, la seule absence de LPCAT1 aux GLCs permettrait à d'autres protéines de s'y associer, et donc de modifier le devenir des GLCs. Par exemple, *via* le déplacement de PLIN2 de la surface des GLCs par la protéine C, augmentant la mobilité de ces dernières *via* la tubuline (Hope RG and McLauchlan J, 2000; Boulant S *et al.*, 2008). La sous-expression de LPCAT1 permettrait de favoriser l'enrobage des GLCs par la protéine C *via* son domaine D2, localisation importante dans le cycle infectieux du virus (Hope RG and McLauchlan J, 2000; Schwer B *et al.*, 2004). Les TAGs stockés au sein des GLCs peuvent participer à la biogénèse des VLDLs par la voie de la β -oxydation dans les mitochondries. Ils peuvent également y participer par leur transfert dans la membrane du RE, qui s'opèrerait *via* le recrutement des GLCs à proximité des globules, potentiellement par un enrichissement des GLCs en Rab18 (*cf.* Chapitre 1 : II.2). Le transfert surviendrait soit par la fusion de la GLC avec un globule situé dans la membrane du RE, fusion qui est de surcroît favorisée par l'extinction de LPCAT1, soit par le biais d'une enzyme analogue à DGAT1 ou la MTP. L'existence de globules demeurant dans la membrane du RE constituerait alors un pont d'échange entre les GLCs et le RE, mais ce mécanisme requiert d'être approfondi, notamment sur les acteurs mis en jeu (Wilfling F *et al.*, 2013; Pol A *et al.*, 2014). De récentes études décrivent le complexe Arf1/COPI, impliqué dans le transfert vésiculaire des VTVs du RE au Golgi, comme médiateur de cette connexion entre les GLCs et le RE (Wilfling F *et al.*, 2014). De plus, il permet le recrutement d'enzymes du métabolisme lipidique à la surface des GLCs comme l'ATGL, la principale enzyme responsable de l'hydrolyse des TAGs (Suzuki M *et al.*,

2015). Les DAGs résultant de cette hydrolyse peuvent alors être utilisés par DGAT1 afin d'enrichir la membrane du RE en TAGs.

L'accumulation intra et extracellulaire d'ApoB observée dans les cellules Huh-7.5.1 déplétées pour LPCAT1 peut provenir soit d'une augmentation de synthèse, soit d'une inhibition de la dégradation de l'ApoB. Compte tenu de l'enrichissement en TAG au sein de la bicouche phospholipidique du RE, il serait plus probable que l'ApoB en cours de synthèse soit davantage lipidée, contribuant ainsi à l'inhibition de sa dégradation. Les TAGs ne sont pas les seuls lipides à stabiliser l'ApoB. Récemment, il a été démontré dans les hépatocytes primaires murins que la protéine de transfert des PLs (PLTP) enrichit l'ApoB en PLs (Manchekar M *et al.*, 2015). Cet enrichissement a pour conséquence une diminution de la dégradation d'ApoB à partir de l'appareil de Golgi, impliquant très probablement PERPP. De façon intéressante, l'inhibition de la PLTP chez la souris conduit à une diminution du contenu des VLDLs en PLs couplée à une augmentation en TAGs et une inhibition de la sécrétion d'ApoB. Cela pourrait expliquer en partie l'enrichissement des particules virales en TAGs *via* la baisse de disponibilité en PLs lors de l'extinction de LPCAT1, ainsi que l'hypobétalipoprotéïnémie observée chez les patients chroniquement infectés par le VHC. *Stricto sensu*, l'hypobétalipoprotéïnémie est une diminution du taux d'ApoB dans le sang, mais n'est pas forcément associée à une diminution du contenu en lipides des VLDLs et donc à une augmentation de leur densité. En effet, une étude sur une petite cohorte de patients chroniquement infectés par le VHC, comparés à des sujets non-infectés, révèle une augmentation de la sécrétion des TAGs néosynthétisés sous forme de VLDLs associée à une diminution de la synthèse de cholestérol (Lambert JE *et al.*, 2013). Cette augmentation de la sécrétion des TAGs synthétisés *de novo* concorde avec nos observations en lignée Huh-7.5.1 déplétée pour LPCAT1. L'ensemble de ces résultats suggère que l'inhibition de sécrétion d'ApoB pourrait permettre une maturation accrue des VLDLs par une hausse de l'enrichissement en TAGs. Cependant, nos résultats ne montrent pas une diminution de la sécrétion de l'ApoB, mais une augmentation. Les mécanismes permettant de limiter la sécrétion d'ApoB requièrent peut-être une infection persistante et prolongée des cellules, représentée par une infection chronique chez le patient.

Dans notre travail l'extinction de LPCAT1 induisait à la fois une augmentation de la sécrétion de particules virales de faibles densités, coïncidant avec une augmentation de la

sécrétion d'ApoB retrouvée à ces mêmes densités. Bien que ces résultats ne démontrent pas l'association physique entre les particules virales et les lipoprotéines contenant l'ApoB, ils sont compatibles avec cette hypothèse.

Celle-ci paraît plausible compte-tenu des observations chez les patients infectés par le VHC, où les particules virales circulent sous forme de LVPs contenant l'ApoB (Andre P *et al.*, 2002; Nielsen SU *et al.*, 2006; Nielsen SU *et al.*, 2008). Il reste que les cellules de la lignée Huh-7 sont défectives pour la production d'authentiques VLDLs (Podevin P *et al.*, 2010; Meex SJ *et al.*, 2011), nourrissant une controverse sur la présence et le rôle d'ApoB dans les VHCcc (Huang H *et al.*, 2007b; Gastaminza P *et al.*, 2008; Jiang J and Luo G, 2009; Merz A *et al.*, 2011; Catanese MT *et al.*, 2013b; Boyer A *et al.*, 2014). L'extinction de LPCAT1 dans notre modèle de culture du VHC, système permettant la production d'authentiques VLDLs (Podevin P *et al.*, 2010), nous a permis de confirmer l'augmentation de la proportion de particules virales de faibles densités, correspondant aux LVPs. Il serait intéressant du point de vue lipidique de caractériser ces LVPs produites, mais s'avère difficile en raison du faible niveau de production de particules virales en HHPs comparé à celui en lignée Huh-7 lors de la caractérisation effectuée par Merz *et al.* (Merz A *et al.*, 2011)

Moessinger et collaborateurs ont publié en 2014 une étude confirmant certains résultats que nous avons obtenus durant ma thèse, notamment sur la déplétion de LPCAT1 en lignée Huh-7 et les modifications induites sur les GLCs (Moessinger C *et al.*, 2014). Les auteurs observent également une diminution du nombre de GLCs, avec une augmentation de leur taille moyenne, lors de l'extinction de LPCAT1 en cellules naïves. Ils ont cependant décrit une modeste diminution de la sécrétion d'ApoB et de TAGs, tandis que nous observons une franche augmentation de ces deux espèces dans le surnageant de culture. Nous expliquons cette divergence par les conditions de cultures employées par Moessinger *et al.* Bien que les cellules soient déplétées pour LPCAT1 et cultivées trois jours avant d'être récoltées comme dans nos conditions, le milieu de culture est dépourvu de SVF durant cette période. Une privation en SVF sur une période aussi longue ne semble pas appropriée, voir néfaste pour les hépatocytes. En effet, cultivées pendant 48 heures en l'absence de SVF, les cellules de la lignée hépatocytaire HLF, présentent une augmentation d'un facteur 10 de la transcription du gène p53 (Terai S *et al.*, 1997). La protéine p53 joue un rôle important dans l'apoptose ainsi que dans l'arrêt de la croissance

cellulaire. Il n'est donc pas exclu que les observations de Moessinger *et al.* puissent uniquement refléter une différence de densité ou de viabilité cellulaire, comme aucune normalisation ni test de cytotoxicité n'ont été réalisés.

De plus, nous avons précédemment montré qu'en l'absence de lipides dans le milieu de culture la sécrétion d'ApoB en Huh-7.5.1 n'est pas stimulée (Podevin P *et al.*, 2010), corrélant avec le fait qu'une absence de TAGs venant enrichir l'ApoB en cours de synthèse conduit à sa dégradation (*cf.* Chapitre 1 : III.2). Enfin, Moessinger *et al.* remplacent le milieu de culture 24 heures avant la récolte, impliquant que les lipides sécrétés les 48 heures précédentes ne sont pas analysés. Compte tenu de l'absence de SVF dans le milieu de culture, et si l'extinction de LPCAT1 augmente la sécrétion des lipides comme nous l'avons montré, il paraît logique que Moessinger et collaborateurs observent une plus faible quantité d'ApoB dans les surnageants dans leurs conditions. En effet, les lipides contenus dans les cellules déplétées pour LPCAT1 doivent être sécrétés plus rapidement que ceux contenus dans les cellules témoins. Une fois les surnageants changés 48 heures plus tard, les cellules déplétées possèdent donc moins de TAGs / ApoB disponibles afin d'être sécrétés dans les milieux de culture neufs. Pour toutes ces raisons, la culture des hépatocytes en l'absence de SVF ne semble donc pas une condition physiologiquement pertinente.

Les patients chroniquement infectés par le VHC présentent fréquemment une stéatose hépatique (Negro F, 2010; Felmlee DJ *et al.*, 2013; Goossens N and Negro F, 2014b; Filipe A and McLauchlan J, 2015), c'est-à-dire une accumulation intracellulaire de TAGs dans les GLCs, phénomène que nous avons pu observer dans les cellules déplétées pour LPCAT1. Il est d'ailleurs rapporté que la diminution du ratio PC / phosphatidyléthanolamine induit une perte de stabilité membranaire et serait à l'origine du développement de la stéatose chez la souris (Li Z *et al.*, 2006). La sous-expression de LPCAT1 causée par le VHC pourrait donc être un des mécanismes responsables de l'apparition de cette pathologie viro-induite. Il serait donc pertinent d'examiner le niveau de transcription de LPCAT1 dans les foies de patients stéatosiques. Le degré d'implication de la stéatose dans la morphogénèse virale demeure inconnu, pouvant être seulement la résultante de l'ensemble des perturbations du métabolisme lipidique lors de l'infection par le VHC.

Les nouveaux traitements développés contre l'hépatite C, les DAAs, ciblent exclusivement les protéines virales afin d'éradiquer la virus. Ces traitements sont très onéreux et potentiellement assujettis à l'échappement viral par la sélection de variants résistants. De plus, les essais cliniques rapportent qu'une faible proportion de patients, notamment ceux atteints par le génotype 3, sont non-répondeurs aux traitements, nécessitant le développement d'autres traitements. Cibler le métabolisme lipidique de l'hôte apparaît comme un stratégie de choix car confèrerait une barrière élevée à l'échappement viral, ainsi qu'une action pangénotypique (Baugh JM *et al.*, 2013). Dans cette perspective, LPCAT1 apparaîtrait comme un candidat intéressant, pouvant réduire à la fois le titre viral, mais aussi diminuer la stéatose chez les patients.

Conclusion générale

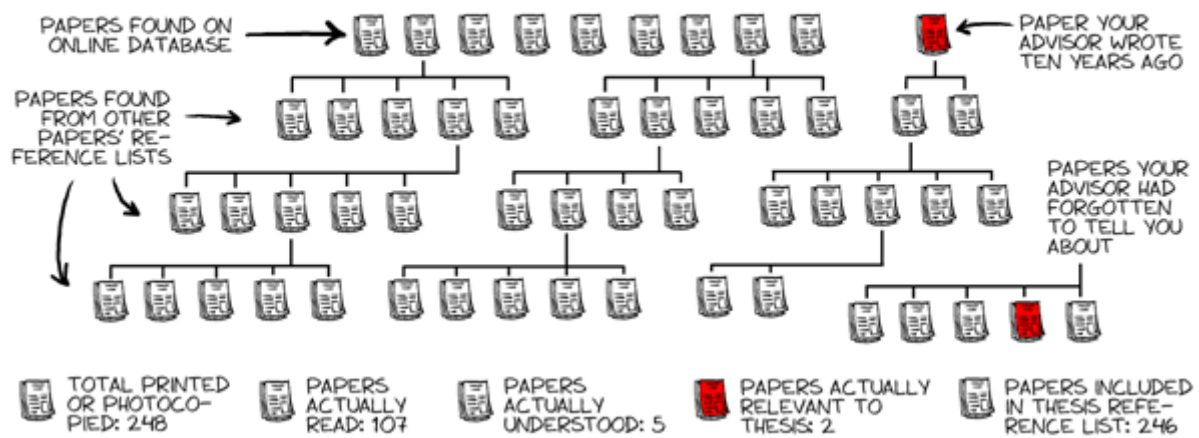
Le foie est un organe crucial dans la régulation des lipides, captant les lipoprotéines circulantes, stockant ou transformant les lipides ainsi incorporés, et les sécrétant à façon lors des besoins physiologiques. Les principales espèces lipidiques sont les TAGs, les PLs et le cholestérol, tous les trois sécrétés par les hépatocytes majoritairement sous forme de VLDLs, les lipoprotéines riches en TAGs synthétisées exclusivement par ces cellules. Le tropisme du VHC pour les hépatocytes provient en partie de son originalité à s'associer aux VLDLs, lui conférant une densité plus faible et un pouvoir infectieux supérieur. Cependant, l'étape de morphogenèse du VHC, notamment des LVPs, demeure la moins comprise du cycle viral. Notre laboratoire a à cœur de disséquer cette étape et les détournements du métabolisme lipidique engendrés par le virus. Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons identifié LPCAT1, une enzyme cellulaire impliquée dans le remodelage des PLs membranaires, comme une cible virale sous-exprimée lors de l'infection par le VHC dans deux modèles cellulaires d'hépatocytes humains. Peu de choses étant connues sur cette enzyme, nous avons exploré son rôle dans le métabolisme lipidique hépatocytaire par extinction de son expression. Nous avons ainsi pu établir que LPCAT1 est impliquée dans la synthèse et la sécrétion des TAGs sous forme de VLDLs, et que cette augmentation de disponibilité de TAGs tend à enrichir les particules virales néosynthétisées. Ces résultats incitent donc à émettre l'hypothèse que la sous-expression de LPCAT1 orchestrée par le VHC apparaît comme une stratégie virale, afin de détourner le métabolisme hépatique, primitivement voué à la sécrétion des TAGs sous forme de VLDLs, au profit de la morphogenèse des LVPs.

REFERENCES

MAKING SURE NO ONE HAS ALREADY WRITTEN YOUR THESIS

phd.stanford.edu

JORGE CHAM © STANFORD DAILY



- Abe, K., T. Kurata and T. Shikata** (1989). "Non-A, non-B hepatitis: visualization of virus-like particles from chimpanzee and human sera." *Arch Virol* **104**(3-4): 351-355.
- Abumrad, N. A. and N. O. Davidson** (2012). "Role of the gut in lipid homeostasis." *Physiol Rev* **92**(3): 1061-1085.
- Acosta-Rivero, N., V. Falcon, C. Alvarez, A. Musacchio, G. Chinea, M. Cristina de la Rosa, A. Rodriguez, S. Duenas-Carrera, V. Tsutsumi, M. Shibayama, I. Menendez, J. Luna-Munoz, M. M. Miranda-Sanchez, J. Kouri and J. Morales-Grillo** (2003). "Structured HCV nucleocapsids composed of P21 core protein assemble primary in the nucleus of *Pichia pastoris* yeast." *Biochemical and biophysical research communications* **310**(1): 48-53.
- Acton, S., A. Rigotti, K. T. Landschulz, S. Xu, H. H. Hobbs and M. Krieger** (1996). "Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor." *Science* **271**(5248): 518-520.
- Acton, S. L., P. E. Scherer, H. F. Lodish and M. Krieger** (1994). "Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor." *J Biol Chem* **269**(33): 21003-21009.
- Adinolfi, L. E., M. Gambardella, A. Andreana, M. F. Tripodi, R. Utili and G. Ruggiero** (2001). "Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity." *Hepatology* **33**(6): 1358-1364.
- Afdhal, N., S. Zeuzem, P. Kwo, M. Chojkier, N. Gitlin, M. Puoti, M. Romero-Gomez, J. P. Zarski, K. Agarwal, P. Buggisch, G. R. Foster, N. Brau, M. Buti, I. M. Jacobson, G. M. Subramanian, X. Ding, H. Mo, J. C. Yang, P. S. Pang, W. T. Symonds, J. G. McHutchison, A. J. Muir, A. Mangia, P. Marcellin and I. O. N. Investigators** (2014). "Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection." *N Engl J Med* **370**(20): 1889-1898.
- Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G. B. Knight and Q. X. Zhang** (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12766-12771.
- Ahn, J., K. S. Chung, D. U. Kim, M. Won, L. Kim, K. S. Kim, M. Nam, S. J. Choi, H. C. Kim, M. Yoon, S. K. Chae and K. L. Hoe** (2004). "Systematic identification of hepatocellular proteins interacting with NS5A of the hepatitis C virus." *J Biochem Mol Biol* **37**(6): 741-748.
- Aizaki, H., K. J. Lee, V. M. Sung, H. Ishiko and M. M. Lai** (2004). "Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts." *Virology* **324**(2): 450-461.
- Albecka, A., S. Belouzard, A. Op de Beeck, V. Descamps, L. Goueslain, J. Bertrand-Michel, F. Terce, G. Duverlie, Y. Rouille and J. Dubuisson** (2012). "Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle." *Hepatology* **55**(4): 998-1007.
- Alexander, C. A., R. L. Hamilton and R. J. Havel** (1976). "Subcellular localization of B apoprotein of plasma lipoproteins in rat liver." *J Cell Biol* **69**(2): 241-263.
- Alter, H. J., R. H. Purcell, P. V. Holland and H. Popper** (1978). "Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis." *Lancet* **1**(8062): 459-463.
- Amako, Y., A. Sarkeshik, H. Hotta, J. Yates, 3rd and A. Siddiqui** (2009). "Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection." *J Virol* **83**(18): 9237-9246.
- Amako, Y., G. H. Syed and A. Siddiqui** (2011). "Protein kinase D negatively regulates hepatitis C virus secretion through phosphorylation of oxysterol-binding protein and ceramide transfer protein." *J Biol Chem* **286**(13): 11265-11274.

- Ambros, V.** (2004). "The functions of animal microRNAs." *Nature* **431**(7006): 350-355.
- Anderson, L. J., K. Lin, T. Compton and B. Wiedmann** (2011). "Inhibition of cyclophilins alters lipid trafficking and blocks hepatitis C virus secretion." *Virology* **8**: 329.
- Andersson, L., P. Bostrom, J. Ericson, M. Rutberg, B. Magnusson, D. Marchesan, M. Ruiz, L. Asp, P. Huang, M. A. Frohman, J. Boren and S. O. Olofsson** (2006). "PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation." *J Cell Sci* **119**(Pt 11): 2246-2257.
- Andre, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J. L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Brechot, G. Paranhos-Baccala and V. Lotteau** (2002). "Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles." *J Virol* **76**(14): 6919-6928.
- Andreo, U., P. Maillard, O. Kalinina, M. Walic, E. Meurs, M. Martinot, P. Marcellin and A. Budkowska** (2007). "Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection." *Cell Microbiol* **9**(10): 2445-2456.
- Appel, N., T. Pietschmann and R. Bartenschlager** (2005). "Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain." *J Virol* **79**(5): 3187-3194.
- Appel, N., M. Zayas, S. Miller, J. Krijnse-Locker, T. Schaller, P. Friebe, S. Kallis, U. Engel and R. Bartenschlager** (2008). "Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly." *PLoS pathogens* **4**(3): e1000035.
- Asselah, T., L. Rubbia-Brandt, P. Marcellin and F. Negro** (2006). "Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter?" *Gut* **55**(1): 123-130.
- Assenat, E., S. Gerbal-Chaloin, D. Larrey, J. Saric, J. M. Fabre, P. Maurel, M. J. Vilarem and J. M. Pascussi** (2004). "Interleukin 1beta inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance." *Hepatology* **40**(4): 951-960.
- Atoom, A. M., D. M. Jones and R. S. Russell** (2013). "Evidence suggesting that HCV p7 protects E2 glycoprotein from premature degradation during virus production." *Virus Res* **176**(1-2): 199-210.
- Banerjee, A., K. Meyer, B. Mazumdar, R. B. Ray and R. Ray** (2010). "Hepatitis C virus differentially modulates activation of forkhead transcription factors and insulin-induced metabolic gene expression." *J Virol* **84**(12): 5936-5946.
- Bankwitz, D., E. Steinmann, J. Bitzegeio, S. Ciesek, M. Friesland, E. Herrmann, M. B. Zeisel, T. F. Baumert, Z. Y. Keck, S. K. Fong, E. I. Pecheur and T. Pietschmann** (2010). "Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes." *J Virol* **84**(11): 5751-5763.
- Barbaro, G., G. Di Lorenzo, A. Asti, M. Ribersani, G. Belloni, B. Grisorio, G. Filice and G. Barbarini** (1999). "Hepatocellular mitochondrial alterations in patients with chronic hepatitis C: ultrastructural and biochemical findings." *Am J Gastroenterol* **94**(8): 2198-2205.
- Barretto, N., B. Sainz, Jr., S. Hussain and S. L. Uprichard** (2014). "Determining the involvement and therapeutic implications of host cellular factors in hepatitis C virus cell-to-cell spread." *J Virol* **88**(9): 5050-5061.
- Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, J. Mous and H. Jacobsen** (1994). "Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing." *J Virol* **68**(8): 5045-5055.

- Bartenschlager, R., V. Lohmann and F. Penin** (2013). "The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection." *Nat Rev Microbiol* **11**(7): 482-496.
- Bartenschlager, R., V. Lohmann, T. Wilkinson and J. O. Koch** (1995). "Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation." *J Virol* **69**(12): 7519-7528.
- Bartenschlager, R., F. Penin, V. Lohmann and P. Andre** (2011). "Assembly of infectious hepatitis C virus particles." *Trends Microbiol* **19**(2): 95-103.
- Barth, H., C. Schafer, M. I. Adah, F. Zhang, R. J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T. H. Van Kuppevelt, E. Depla, F. Von Weizsacker, H. E. Blum and T. F. Baumert** (2003). "Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate." *J Biol Chem* **278**(42): 41003-41012.
- Bartosch, B., J. Bukh, J. C. Meunier, C. Granier, R. E. Engle, W. C. Blackwelder, S. U. Emerson, F. L. Cosset and R. H. Purcell** (2003a). "In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14199-14204.
- Bartosch, B., G. Verney, M. Dreux, P. Donot, Y. Morice, F. Penin, J. M. Pawlotsky, D. Lavillette and F. L. Cosset** (2005). "An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies." *J Virol* **79**(13): 8217-8229.
- Bartosch, B., A. Vitelli, C. Granier, C. Goujon, J. Dubuisson, S. Pascale, E. Scarselli, R. Cortese, A. Nicosia and F. L. Cosset** (2003b). "Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor." *J Biol Chem* **278**(43): 41624-41630.
- Bartz, R., J. K. Zehmer, M. Zhu, Y. Chen, G. Serrero, Y. Zhao and P. Liu** (2007). "Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation." *J Proteome Res* **6**(8): 3256-3265.
- Bassett, S. E., D. L. Thomas, K. M. Brasky and R. E. Lanford** (1999). "Viral persistence, antibody to E1 and E2, and hypervariable region 1 sequence stability in hepatitis C virus-inoculated chimpanzees." *J Virol* **73**(2): 1118-1126.
- Baugh, J. M., J. A. Garcia-Rivera and P. A. Gallay** (2013). "Host-targeting agents in the treatment of hepatitis C: a beginning and an end?" *Antiviral Res* **100**(2): 555-561.
- Baumert, T. F., S. Ito, D. T. Wong and T. J. Liang** (1998). "Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells." *J Virol* **72**(5): 3827-3836.
- Beames, B., D. Chavez, B. Guerra, L. Notvall, K. M. Brasky and R. E. Lanford** (2000). "Development of a primary tamarin hepatocyte culture system for GB virus-B: a surrogate model for hepatitis C virus." *J Virol* **74**(24): 11764-11772.
- Beard, M. R., G. Abell, M. Honda, A. Carroll, M. Gartland, B. Clarke, K. Suzuki, R. Lanford, D. V. Sangar and S. M. Lemon** (1999). "An infectious molecular clone of a Japanese genotype 1b hepatitis C virus." *Hepatology* **30**(1): 316-324.
- Beaumont, E., R. Patient, C. Hourieux, I. Dimier-Poisson and P. Roingeard** (2013). "Chimeric hepatitis B virus/hepatitis C virus envelope proteins elicit broadly neutralizing antibodies and constitute a potential bivalent prophylactic vaccine." *Hepatology* **57**(4): 1303-1313.
- Beaumont, E. and P. Roingeard** (2015). "Chimeric hepatitis B virus (HBV)/hepatitis C virus (HCV) subviral envelope particles induce efficient anti-HCV antibody production in animals pre-immunized with HBV vaccine." *Vaccine* **33**(8): 973-976.

- Behrens, S. E., L. Tomei and R. De Francesco** (1996). "Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." *EMBO J* **15**(1): 12-22.
- Benedicto, I., F. Molina-Jimenez, O. Barreiro, A. Maldonado-Rodriguez, J. Prieto, R. Moreno-Otero, R. Aldabe, M. Lopez-Cabrera and P. L. Majano** (2008). "Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum." *Hepatology* **48**(4): 1044-1053.
- Benga, W. J., S. E. Krieger, M. Dimitrova, M. B. Zeisel, M. Parnot, J. Lupberger, E. Hildt, G. Luo, J. McLauchlan, T. F. Baumert and C. Schuster** (2010). "Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles." *Hepatology* **51**(1): 43-53.
- Bentham, M. J., T. L. Foster, C. McCormick and S. Griffin** (2013). "Mutations in hepatitis C virus p7 reduce both the egress and infectivity of assembled particles via impaired proton channel function." *J Gen Virol* **94**(Pt 10): 2236-2248.
- Beran, R. K., B. D. Lindenbach and A. M. Pyle** (2009). "The NS4A protein of hepatitis C virus promotes RNA-coupled ATP hydrolysis by the NS3 helicase." *J Virol* **83**(7): 3268-3275.
- Berg, T., M. von Wagner, S. Nasser, C. Sarrazin, T. Heintges, T. Gerlach, P. Buggisch, T. Goeser, J. Rasenack, G. R. Pape, W. E. Schmidt, B. Kallinowski, H. Klinker, U. Spengler, P. Martus, U. Alshuth and S. Zeuzem** (2006). "Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin." *Gastroenterology* **130**(4): 1086-1097.
- Berger, K. L., S. M. Kelly, T. X. Jordan, M. A. Tartell and G. Randall** (2011). "Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication." *J Virol* **85**(17): 8870-8883.
- Bickel, P. E., J. T. Tansey and M. A. Welte** (2009). "PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores." *Biochimica et biophysica acta* **1791**(6): 419-440.
- Biron-Andreani, C., C. Bezat-Bouchahda, E. Raulet, L. Pichard-Garcia, J. M. Fabre, J. Saric, J. Baulieux, J. F. Schved and P. Maurel** (2004). "Secretion of functional plasma haemostasis proteins in long-term primary cultures of human hepatocytes." *Br J Haematol* **125**(5): 638-646.
- Blackham, S., A. Baillie, F. Al-Hababi, K. Remlinger, S. You, R. Hamatake and M. J. McGarvey** (2010). "Gene expression profiling indicates the roles of host oxidative stress, apoptosis, lipid metabolism, and intracellular transport genes in the replication of hepatitis C virus." *J Virol* **84**(10): 5404-5414.
- Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski and Y. Rouille** (2006). "Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis." *J Virol* **80**(14): 6964-6972.
- Blanchard, E., D. Brand, S. Trassard, A. Goudeau and P. Roingeard** (2002). "Hepatitis C virus-like particle morphogenesis." *J Virol* **76**(8): 4073-4079.
- Blight, K. J., J. A. McKeating and C. M. Rice** (2002). "Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication." *J Virol* **76**(24): 13001-13014.
- Bose, S. K., H. Kim, K. Meyer, N. Wolins, N. O. Davidson and R. Ray** (2014). "Forkhead box transcription factor regulation and lipid accumulation by hepatitis C virus." *J Virol* **88**(8): 4195-4203.

- Bose, S. K., S. Shrivastava, K. Meyer, R. B. Ray and R. Ray** (2012). "Hepatitis C virus activates the mTOR/S6K1 signaling pathway in inhibiting IRS-1 function for insulin resistance." *J Virol* **86**(11): 6315-6322.
- Bosman, C., M. B. Valli, L. Bertolini, A. Serafino, R. Boldrini, M. Marcellini and G. Carloni** (1998). "Detection of virus-like particles in liver biopsies from HCV-infected patients." *Res Virol* **149**(5): 311-314.
- Boson, B., O. Granio, R. Bartenschlager and F. L. Cosset** (2011). "A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly." *PLoS pathogens* **7**(7): e1002144.
- Bostrom, P., L. Andersson, M. Rutberg, J. Perman, U. Lidberg, B. R. Johansson, J. Fernandez-Rodriguez, J. Ericson, T. Nilsson, J. Boren and S. O. Olofsson** (2007). "SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity." *Nat Cell Biol* **9**(11): 1286-1293.
- Boulant, S., M. Becchi, F. Penin and J. P. Laverne** (2003). "Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b." *J Biol Chem* **278**(46): 45785-45792.
- Boulant, S., M. W. Douglas, L. Moody, A. Budkowska, P. Targett-Adams and J. McLauchlan** (2008). "Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner." *Traffic* **9**(8): 1268-1282.
- Boulant, S., R. Montserret, R. G. Hope, M. Ratnier, P. Targett-Adams, J. P. Laverne, F. Penin and J. McLauchlan** (2006). "Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets." *J Biol Chem* **281**(31): 22236-22247.
- Boulant, S., P. Targett-Adams and J. McLauchlan** (2007). "Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus." *J Gen Virol* **88**(Pt 8): 2204-2213.
- Boulant, S., C. Vanbelle, C. Ebel, F. Penin and J. P. Laverne** (2005). "Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features." *J Virol* **79**(17): 11353-11365.
- Boyer, A., A. Dumans, E. Beaumont, L. Etienne, P. Roingard and J. C. Meunier** (2014). "The association of hepatitis C virus glycoproteins with apolipoproteins E and B early in assembly is conserved in lipoviral particles." *J Biol Chem* **289**(27): 18904-18913.
- Bradley, D., K. McCaustland, K. Krawczynski, J. Spelbring, C. Humphrey and E. H. Cook** (1991). "Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose." *J Med Virol* **34**(3): 206-208.
- Branch, A. D., D. D. Stump, J. A. Gutierrez, F. Eng and J. L. Walewski** (2005). "The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others." *Semin Liver Dis* **25**(1): 105-117.
- Brasaemle, D. L. and N. E. Wolins** (2012). "Packaging of fat: an evolving model of lipid droplet assembly and expansion." *J Biol Chem* **287**(4): 2273-2279.
- Brass, V., E. Bieck, R. Montserret, B. Wolk, J. A. Hellings, H. E. Blum, F. Penin and D. Moradpour** (2002). "An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A." *J Biol Chem* **277**(10): 8130-8139.
- Brazzoli, M., A. Bianchi, S. Filippini, A. Weiner, Q. Zhu, M. Pizza and S. Crotta** (2008). "CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes." *J Virol* **82**(17): 8316-8329.

- Bressanelli, S., L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R. L. Vitale, M. Mathieu, R. De Francesco and F. A. Rey** (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13034-13039.
- Bridges, J. P., M. Ikegami, L. L. Brilli, X. Chen, R. J. Mason and J. M. Shannon** (2010). "LPCAT1 regulates surfactant phospholipid synthesis and is required for transitioning to air breathing in mice." *J Clin Invest* **120**(5): 1736-1748.
- Brillanti, S., J. Garson, M. Foli, K. Whitby, R. Deaville, C. Masci, M. Miglioli and L. Barbara** (1994). "A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa for interferon alfa-resistant chronic hepatitis C." *Gastroenterology* **107**(3): 812-817.
- Brimacombe, C. L., J. Grove, L. W. Meredith, K. Hu, A. J. Syder, M. V. Flores, J. M. Timpe, S. E. Krieger, T. F. Baumert, T. L. Tellinghuisen, F. Wong-Staal, P. Balfe and J. A. McKeating** (2011). "Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission." *J Virol* **85**(1): 596-605.
- Buck, M.** (2008). "Direct infection and replication of naturally occurring hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3 and 4 in normal human hepatocyte cultures." *PLoS one* **3**(7): e2660.
- Bukh, J., R. H. Miller and R. H. Purcell** (1995). "Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes." *Semin Liver Dis* **15**(1): 41-63.
- Bukh, J., R. H. Purcell and R. H. Miller** (1994). "Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(17): 8239-8243.
- Bulankina, A. V., A. Deggerich, D. Wenzel, K. Mutenda, J. G. Wittmann, M. G. Rudolph, K. N. Burger and S. Honing** (2009). "TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets." *J Cell Biol* **185**(4): 641-655.
- Burbelo, P. D., E. J. Dubovi, P. Simmonds, J. L. Medina, J. A. Henriquez, N. Mishra, J. Wagner, R. Tokarz, J. M. Cullen, M. J. Iadarola, C. M. Rice, W. I. Lipkin and A. Kapoor** (2012). "Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host." *J Virol* **86**(11): 6171-6178.
- Butler, P. L. and R. K. Mallampalli** (2010). "Cross-talk between remodeling and de novo pathways maintains phospholipid balance through ubiquitination." *J Biol Chem* **285**(9): 6246-6258.
- Calland, N., M. E. Sahuc, S. Belouzard, V. Pene, P. Bonnafous, A. A. Mesalam, G. Deloison, V. Descamps, S. Sahpaz, C. Wychowski, O. Lambert, P. Brodin, G. Duverlie, P. Meuleman, A. R. Rosenberg, J. Dubuisson, Y. Rouille and K. Seron** (2015). "Polyphenols Inhibit Hepatitis C Virus Entry by a New Mechanism of Action." *J Virol* **89**(19): 10053-10063.
- Camus, G., E. Herker, A. A. Modi, J. T. Haas, H. R. Ramage, R. V. Farese, Jr. and M. Ott** (2013). "Diacylglycerol acyltransferase-1 localizes hepatitis C virus NS5A protein to lipid droplets and enhances NS5A interaction with the viral capsid core." *J Biol Chem* **288**(14): 9915-9923.
- Carpentier, A., A. Tesfaye, V. Chu, I. Nimgaonkar, F. Zhang, S. B. Lee, S. S. Thorgeirsson, S. M. Feinstone and T. J. Liang** (2014). "Engrafted human stem cell-derived hepatocytes establish an infectious HCV murine model." *J Clin Invest* **124**(11): 4953-4964.
- Carrere-Kremer, S., C. Montpellier-Pala, L. Cocquerel, C. Wychowski, F. Penin and J. Dubuisson** (2002). "Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus." *J Virol* **76**(8): 3720-3730.
- Carriere, M., A. R. Rosenberg, F. Conti, S. Chouzenoux, B. Terris, P. Sogni, O. Soubrane, Y. Calmus and P. Podevin** (2006). "Low density lipoprotein receptor transcripts correlates with liver hepatitis C virus RNA in patients with alcohol consumption." *J Viral Hepat* **13**(9): 633-642.

- Cartwright, B. R. and J. M. Goodman** (2012). "Seipin: from human disease to molecular mechanism." *J Lipid Res* **53**(6): 1042-1055.
- Castera, L., C. Hezode, F. Roudot-Thoraval, I. Lonjon, E. S. Zafrani, J. M. Pawlotsky and D. Dhumeaux** (2004). "Effect of antiviral treatment on evolution of liver steatosis in patients with chronic hepatitis C: indirect evidence of a role of hepatitis C virus genotype 3 in steatosis." *Gut* **53**(3): 420-424.
- Castet, V., C. Fournier, A. Soulier, R. Brillet, J. Coste, D. Larrey, D. Dhumeaux, P. Maurel and J. M. Pawlotsky** (2002). "Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro." *J Virol* **76**(16): 8189-8199.
- Catanese, M. T., R. Graziani, T. von Hahn, M. Moreau, T. Huby, G. Paonessa, C. Santini, A. Luzzago, C. M. Rice, R. Cortese, A. Vitelli and A. Nicosia** (2007). "High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein." *J Virol* **81**(15): 8063-8071.
- Catanese, M. T., J. Loureiro, C. T. Jones, M. Dorner, T. von Hahn and C. M. Rice** (2013a). "Different requirements for scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus cell-free versus cell-to-cell transmission." *J Virol* **87**(15): 8282-8293.
- Catanese, M. T., K. Uryu, M. Kopp, T. J. Edwards, L. Andrus, W. J. Rice, M. Silvestry, R. J. Kuhn and C. M. Rice** (2013b). "Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(23): 9505-9510.
- Chang, K. S., J. Jiang, Z. Cai and G. Luo** (2007). "Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture." *J Virol* **81**(24): 13783-13793.
- Chao, T. C., W. C. Su, J. Y. Huang, Y. C. Chen, K. S. Jeng, H. D. Wang and M. M. Lai** (2012). "Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 (PSTPIP2), a host membrane-deforming protein, is critical for membranous web formation in hepatitis C virus replication." *J Virol* **86**(3): 1739-1749.
- Chappel, S., D. Buckler, C. Kelton and N. E. Tayar** (1998). "Follicle stimulating hormone and its receptor: future perspectives." *Hum Reprod* **13 Suppl 3**: 18-35; discussion 47-51.
- Chen, H. C., S. J. Smith, Z. Ladha, D. R. Jensen, L. D. Ferreira, L. K. Pulawa, J. G. McGuire, R. E. Pitas, R. H. Eckel and R. V. Farese, Jr.** (2002). "Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1." *J Clin Invest* **109**(8): 1049-1055.
- Chen, X., B. A. Hyatt, M. L. Mucenski, R. J. Mason and J. M. Shannon** (2006). "Identification and characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar type II cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(31): 11724-11729.
- Chen, Z., J. Y. Norris and B. N. Finck** (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) stimulates VLDL assembly through activation of cell death-inducing DFFA-like effector B (CideB)." *J Biol Chem* **285**(34): 25996-26004.
- Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley and M. Houghton** (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." *Science* **244**(4902): 359-362.
- Choo, Q. L., K. H. Richman, J. H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, R. Medina-Selby, P. J. Barr and et al.** (1991). "Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6): 2451-2455.

- Clarke, D., S. Griffin, L. Beales, C. S. Gelais, S. Burgess, M. Harris and D. Rowlands** (2006). "Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro." *J Biol Chem* **281**(48): 37057-37068.
- Clement, S., C. Fauvelle, E. Branche, V. Kaddai, S. Conzelmann, T. Boldanova, B. Bartosch, K. Minehira and F. Negro** (2013). "Role of seipin in lipid droplet morphology and hepatitis C virus life cycle." *J Gen Virol* **94**(Pt 10): 2208-2214.
- Clement, S., M. Peyrou, A. Sanchez-Pareja, L. Bourgoïn, P. Ramadori, D. Suter, M. Vinciguerra, K. Guilloux, S. Pascarella, L. Rubbia-Brandt, F. Negro and M. Foti** (2011). "Down-regulation of phosphatase and tensin homolog by hepatitis C virus core 3a in hepatocytes triggers the formation of large lipid droplets." *Hepatology* **54**(1): 38-49.
- Cocquerel, L., C. Wychowski, F. Minner, F. Penin and J. Dubuisson** (2000). "Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins." *J Virol* **74**(8): 3623-3633.
- Coller, K. E., N. S. Heaton, K. L. Berger, J. D. Cooper, J. L. Saunders and G. Randall** (2012). "Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion." *PLoS pathogens* **8**(1): e1002466.
- Colman, H., C. Le Berre-Scoul, C. Hernandez, S. Pierredon, A. Bihouee, R. Houlgatte, S. Vagner, A. R. Rosenberg and C. Feray** (2013). "Genome-wide analysis of host mRNA translation during hepatitis C virus infection." *J Virol* **87**(12): 6668-6677.
- Cornberg, M., H. A. Razavi, A. Alberti, E. Bernasconi, M. Buti, C. Cooper, O. Dalgard, J. F. Dillon, R. Flisiak, X. Forn, S. Frankova, A. Goldis, I. Goulis, W. Halota, B. Hunyady, M. Lagging, A. Largen, M. Makara, S. Manolakopoulos, P. Marcellin, R. T. Marinho, S. Pol, T. Poynard, M. Puoti, O. Sagalova, S. Sibbel, K. Simon, C. Wallace, K. Young, C. Yurdaydin, et al.** (2011). "A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel." *Liver Int.* **31 Suppl 2**: 30-60.
- Cristofari, G., R. Ivanyi-Nagy, C. Gabus, S. Boulant, J. P. Lavergne, F. Penin and J. L. Darlix** (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**(8): 2623-2631.
- Cun, W., J. Jiang and G. Luo** (2010). "The C-terminal alpha-helix domain of apolipoprotein E is required for interaction with nonstructural protein 5A and assembly of hepatitis C virus." *J Virol* **84**(21): 11532-11541.
- D'Angelo, G., E. Polishchuk, G. Di Tullio, M. Santoro, A. Di Campli, A. Godi, G. West, J. Bielawski, C. C. Chuang, A. C. van der Spoel, F. M. Platt, Y. A. Hannun, R. Polishchuk, P. Mattjus and M. A. De Matteis** (2007). "Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide." *Nature* **449**(7158): 62-67.
- Da Costa, D., M. Turek, D. J. Felmlee, E. Girardi, S. Pfeffer, G. Long, R. Bartenschlager, M. B. Zeisel and T. F. Baumert** (2012). "Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in nonhepatic cells." *J Virol* **86**(21): 11919-11925.
- Dansako, H., H. Hiramoto, M. Ikeda, T. Wakita and N. Kato** (2014). "Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets." *Virology* **462-463**: 166-174.
- Dao Thi, V. L., C. Granier, M. B. Zeisel, M. Guerin, J. Mancip, O. Granio, F. Penin, D. Lavillette, R. Bartenschlager, T. F. Baumert, F. L. Cosset and M. Dreux** (2012). "Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps." *J Biol Chem* **287**(37): 31242-31257.

- Davis, C., H. J. Harris, K. Hu, H. E. Drummer, J. A. McKeating, J. G. Mullins and P. Balfe** (2012). "In silico directed mutagenesis identifies the CD81/cludin-1 hepatitis C virus receptor interface." *Cell Microbiol* **14**(12): 1892-1903.
- De Vos, R., C. Verslype, E. Depla, J. Fevery, B. Van Damme, V. Desmet and T. Roskams** (2002). "Ultrastructural visualization of hepatitis C virus components in human and primate liver biopsies." *Journal of hepatology* **37**(3): 370-379.
- Decaens, C., M. Durand, B. Grosse and D. Cassio** (2008). "Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity?" *Biol Cell* **100**(7): 387-398.
- Delarocque-Astagneau, E., C. Meffre, F. Dubois, C. Pioche, Y. Le Strat, F. Roudot-Thoraval, P. Hillon, C. Silvain, D. Dhumeaux, J. C. Desenclos, C. S. S. C. Hepatitis, B. Scientific Committee for the National Prevalence Survey of Hepatitis and C. Markers** (2010). "The impact of the prevention programme of hepatitis C over more than a decade: the French experience." *J Viral Hepat* **17**(6): 435-443.
- Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y. S. Hahn, C. M. Rice and J. Dubuisson** (1997). "Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes." *J Virol* **71**(1): 697-704.
- Demeure, O., F. Lecerf, C. Duby, C. Desert, S. Ducheix, H. Guillou and S. Lagarrigue** (2011). "Regulation of LPCAT3 by LXR." *Gene* **470**(1-2): 7-11.
- Deuffic-Burban, S., P. Deltenre, M. Buti, T. Stroffolini, J. Parkes, N. Muhlberger, U. Siebert, C. Moreno, A. Hatzakis, W. Rosenberg, S. Zeuzem and P. Mathurin** (2012). "Predicted effects of treatment for HCV infection vary among European countries." *Gastroenterology* **143**(4): 974-985 e914.
- Dharancy, S., M. Malapel, G. Perlemuter, T. Roskams, Y. Cheng, L. Dubuquoy, P. Podevin, F. Conti, V. Canva, D. Philippe, L. Gambiez, P. Mathurin, J. C. Paris, K. Schoonjans, Y. Calmus, S. Pol, J. Auwerx and P. Desreumaux** (2005). "Impaired expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha during hepatitis C virus infection." *Gastroenterology* **128**(2): 334-342.
- Di Leo, E., S. Lancellotti, J. Y. Penacchioni, A. B. Cefalu, M. Averna, L. Pisciotta, S. Bertolini, S. Calandra, C. Gabelli and P. Tarugi** (2005). "Mutations in MTP gene in abeta- and hypobeta-lipoproteinemia." *Atherosclerosis* **180**(2): 311-318.
- Diamond, D. L., A. J. Syder, J. M. Jacobs, C. M. Sorensen, K. A. Walters, S. C. Proll, J. E. McDermott, M. A. Gritsenko, Q. Zhang, R. Zhao, T. O. Metz, D. G. Camp, 2nd, K. M. Waters, R. D. Smith, C. M. Rice and M. G. Katze** (2010). "Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics." *PLoS pathogens* **6**(1): e1000719.
- Diao, J., H. Pantua, H. Ngu, L. Komuves, L. Diehl, G. Schaefer and S. B. Kapadia** (2012). "Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry." *J Virol* **86**(20): 10935-10949.
- Diaz, O., M. Cubero, M. A. Trabaud, J. Quer, V. Icard, J. I. Esteban, V. Lotteau and P. Andre** (2008). "Transmission of low-density hepatitis C viral particles during sexually transmitted acute resolving infection." *J Med Virol* **80**(2): 242-246.
- Diaz, O., F. Delers, M. Maynard, S. Demignot, F. Zoulim, J. Chambaz, C. Trepo, V. Lotteau and P. Andre** (2006). "Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins." *J Gen Virol* **87**(Pt 10): 2983-2991.
- Douam, F., V. L. Dao Thi, G. Maurin, J. Fresquet, D. Mompelat, M. B. Zeisel, T. F. Baumert, F. L. Cosset and D. Lavillette** (2014). "Critical interaction between E1 and E2 glycoproteins determines binding and fusion properties of hepatitis C virus during cell entry." *Hepatology* **59**(3): 776-788.

- Douam, F., D. Lavillette and F. L. Cosset** (2015). "The mechanism of HCV entry into host cells." *Prog Mol Biol Transl Sci* **129**: 63-107.
- Dreux, M., B. Boson, S. Ricard-Blum, J. Molle, D. Lavillette, B. Bartosch, E. I. Pecheur and F. L. Cosset** (2007). "The exchangeable apolipoprotein ApoC-I promotes membrane fusion of hepatitis C virus." *J Biol Chem* **282**(44): 32357-32369.
- Dreux, M., T. Pietschmann, C. Granier, C. Voisset, S. Ricard-Blum, P. E. Mangeot, Z. Keck, S. Foung, N. Vu-Dac, J. Dubuisson, R. Bartenschlager, D. Lavillette and F. L. Cosset** (2006). "High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI." *J Biol Chem* **281**(27): 18285-18295.
- Drocourt, L., J. C. Ourlin, J. M. Pascussi, P. Maurel and M. J. Vilarem** (2002). "Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes." *J Biol Chem* **277**(28): 25125-25132.
- Drummer, H. E., A. Maerz and P. Pountourios** (2003). "Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins." *FEBS Lett* **546**(2-3): 385-390.
- Drummer, H. E., K. A. Wilson and P. Pountourios** (2002). "Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81." *J Virol* **76**(21): 11143-11147.
- Dubuisson, J., S. Duvet, J. C. Meunier, A. Op De Beeck, R. Cacan, C. Wychowski and L. Cocquerel** (2000). "Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 is dependent on the presence of a downstream sequence on the viral polyprotein." *J Biol Chem* **275**(39): 30605-30609.
- Dubuisson, J., H. H. Hsu, R. C. Cheung, H. B. Greenberg, D. G. Russell and C. M. Rice** (1994). "Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses." *J Virol* **68**(10): 6147-6160.
- Dubuisson, J., F. Penin and D. Moradpour** (2002). "Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids." *Trends Cell Biol* **12**(11): 517-523.
- Dunn, J. C., R. G. Tompkins and M. L. Yarmush** (1991). "Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration." *Biotechnol Prog* **7**(3): 237-245.
- Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour and K. Bienz** (2002). "Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex." *J Virol* **76**(12): 5974-5984.
- Einav, S., M. Elazar, T. Danieli and J. S. Glenn** (2004). "A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication." *J Virol* **78**(20): 11288-11295.
- Elazar, M., K. H. Cheong, P. Liu, H. B. Greenberg, C. M. Rice and J. S. Glenn** (2003). "Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication." *J Virol* **77**(10): 6055-6061.
- Erdtmann, L., N. Franck, H. Lerat, J. Le Seyec, D. Gilot, I. Cannie, P. Gripon, U. Hibner and C. Guguen-Guillouzo** (2003). "The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis." *J Biol Chem* **278**(20): 18256-18264.
- Erickson, A. L., M. Houghton, Q. L. Choo, A. J. Weiner, R. Ralston, E. Muchmore and C. M. Walker** (1993). "Hepatitis C virus-specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C." *J Immunol* **151**(8): 4189-4199.
- Esau, C., S. Davis, S. F. Murray, X. X. Yu, S. K. Pandey, M. Pear, L. Watts, S. L. Booten, M. Graham, R. McKay, A. Subramaniam, S. Propp, B. A. Lollo, S. Freier,**

- C. F. Bennett, S. Bhanot and B. P. Monia** (2006). "miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting." *Cell Metab* **3**(2): 87-98.
- Eto, M., H. Shindou, A. Koeberle, T. Harayama, K. Yanagida and T. Shimizu** (2012). "Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 is the key enzyme for incorporating arachidonic acid into glycerophospholipids during adipocyte differentiation." *Int J Mol Sci* **13**(12): 16267-16280.
- Eurosurveillance editorial, t.** (2013). "The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction publishes the European Drug Report 2013: trends and developments." *Euro Surveill* **18**(22).
- Evans, M. J., T. von Hahn, D. M. Tscherne, A. J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J. A. McKeating, P. D. Bieniasz and C. M. Rice** (2007). "Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry." *Nature* **446**(7137): 801-805.
- Failla, C., L. Tomei and R. De Francesco** (1994). "Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins." *J Virol* **68**(6): 3753-3760.
- Falkowska, E., F. Kajumo, E. Garcia, J. Reinus and T. Dragic** (2007). "Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization." *J Virol* **81**(15): 8072-8079.
- Farci, P., A. Shimoda, D. Wong, T. Cabezon, D. De Gioannis, A. Strazzer, Y. Shimizu, M. Shapiro, H. J. Alter and R. H. Purcell** (1996). "Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26): 15394-15399.
- Farese, R. V., Jr. and T. C. Walther** (2009). "Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T." *Cell* **139**(5): 855-860.
- Farquhar, M. J., K. Hu, H. J. Harris, C. Davis, C. L. Brimacombe, S. J. Fletcher, T. F. Baumert, J. Z. Rappoport, P. Balfe and J. A. McKeating** (2012). "Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis." *J Virol* **86**(8): 4305-4316.
- Fei, W., G. Shui, Y. Zhang, N. Kraemer, C. Ferguson, T. S. Kapterian, R. C. Lin, I. W. Dawes, A. J. Brown, P. Li, X. Huang, R. G. Parton, M. R. Wenk, T. C. Walther and H. Yang** (2011). "A role for phosphatidic acid in the formation of "supersized" lipid droplets." *PLoS Genet* **7**(7): e1002201.
- Feingold, K. R. and C. Grunfeld (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. *Endotext*. L. J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos et al. South Dartmouth (MA).
- Felmlee, D. J., M. L. Hafirassou, M. Lefevre, T. F. Baumert and C. Schuster** (2013). "Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease." *Viruses* **5**(5): 1292-1324.
- Felmlee, D. J., C. Schuster and T. F. Baumert** (2014). "New tool for the study of hepatitis C virus genotype 3 and its associated liver disease biology." *Hepatology* **60**(6): 1806-1808.
- Ferraris, P., E. Beaumont, R. Uzbekov, D. Brand, J. Gaillard, E. Blanchard and P. Roingeard** (2013). "Sequential biogenesis of host cell membrane rearrangements induced by hepatitis C virus infection." *Cell Mol Life Sci* **70**(7): 1297-1306.
- Ferraris, P., E. Blanchard and P. Roingeard** (2010). "Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes." *J Gen Virol* **91**(Pt 9): 2230-2237.
- Filipe, A. and J. McLauchlan** (2015). "Hepatitis C virus and lipid droplets: finding a niche." *Trends Mol Med* **21**(1): 34-42.

- Fiorucci, M., S. Boulant, A. Fournillier, J. D. Abraham, J. P. Lavergne, G. Paranhos-Baccala, G. Inchauspe and C. Bain** (2007). "Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries." *J Gen Virol* **88**(Pt 4): 1149-1162.
- Fisher, E. A.** (2012). "The degradation of apolipoprotein B100: multiple opportunities to regulate VLDL triglyceride production by different proteolytic pathways." *Biochimica et biophysica acta* **1821**(5): 778-781.
- Fisher, E. A., M. Pan, X. Chen, X. Wu, H. Wang, H. Jamil, J. D. Sparks and K. J. Williams** (2001). "The triple threat to nascent apolipoprotein B. Evidence for multiple, distinct degradative pathways." *J Biol Chem* **276**(30): 27855-27863.
- Fournier, C., C. Sureau, J. Coste, J. Ducos, G. Pageaux, D. Larrey, J. Domergue and P. Maurel** (1998). "In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus." *J Gen Virol* **79** (Pt 10): 2367-2374.
- Franck, N., J. Le Seyec, C. Guguen-Guillouzo and L. Erdtmann** (2005). "Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome." *J Virol* **79**(5): 2700-2708.
- Fraser, C. S. and J. A. Doudna** (2007). "Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation." *Nat Rev Microbiol* **5**(1): 29-38.
- Friebe, P. and R. Bartenschlager** (2002). "Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication." *J Virol* **76**(11): 5326-5338.
- Friebe, P., J. Boudet, J. P. Simorre and R. Bartenschlager** (2005). "Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication." *J Virol* **79**(1): 380-392.
- Fried, M. W., M. L. Shiffman, K. R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F. L. Goncales, Jr., D. Haussinger, M. Diago, G. Carosi, D. Dhumeaux, A. Craxi, A. Lin, J. Hoffman and J. Yu** (2002). "Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection." *N Engl J Med* **347**(13): 975-982.
- Fujimoto, Y., H. Itabe, J. Sakai, M. Makita, J. Noda, M. Mori, Y. Higashi, S. Kojima and T. Takano** (2004). "Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7." *Biochimica et biophysica acta* **1644**(1): 47-59.
- Fuller, N. and R. P. Rand** (2001). "The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes." *Biophys J* **81**(1): 243-254.
- Gaither, L. A., J. Borawski, L. J. Anderson, K. A. Balabanis, P. Devay, G. Joberty, C. Rau, M. Schirle, T. Bouwmeester, C. Mickanin, S. Zhao, C. Vickers, L. Lee, G. Deng, J. Baryza, R. A. Fujimoto, K. Lin, T. Compton and B. Wiedmann** (2010). "Multiple cyclophilins involved in different cellular pathways mediate HCV replication." *Virology* **397**(1): 43-55.
- Gale, M., Jr. and E. M. Foy** (2005). "Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus." *Nature* **436**(7053): 939-945.
- Gao, L., H. Aizaki, J. W. He and M. M. Lai** (2004). "Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft." *J Virol* **78**(7): 3480-3488.
- Gao, L., H. Tu, S. T. Shi, K. J. Lee, M. Asanaka, S. B. Hwang and M. M. Lai** (2003). "Interaction with a ubiquitin-like protein enhances the ubiquitination and degradation of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase." *J Virol* **77**(7): 4149-4159.

- Gastaminza, P., G. Cheng, S. Wieland, J. Zhong, W. Liao and F. V. Chisari** (2008). "Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion." *J Virol* **82**(5): 2120-2129.
- Gastaminza, P., K. A. Dryden, B. Boyd, M. R. Wood, M. Law, M. Yeager and F. V. Chisari** (2010). "Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture." *J Virol* **84**(21): 10999-11009.
- Gastaminza, P., S. B. Kapadia and F. V. Chisari** (2006). "Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles." *J Virol* **80**(22): 11074-11081.
- Gentsch, J., C. Brohm, E. Steinmann, M. Friesland, N. Menzel, G. Vieyres, P. M. Perin, A. Frentzen, L. Kaderali and T. Pietschmann** (2013). "hepatitis c Virus p7 is critical for capsid assembly and envelopment." *PLoS pathogens* **9**(5): e1003355.
- Gerbai-Chaloin, S., M. Daujat, J. M. Pascussi, L. Pichard-Garcia, M. J. Vilarem and P. Maurel** (2002). "Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor." *J Biol Chem* **277**(1): 209-217.
- Ghany, M. G., D. R. Nelson, D. B. Strader, D. L. Thomas, L. B. Seeff and D. American Association for Study of Liver** (2011). "An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases." *Hepatology* **54**(4): 1433-1444.
- Gibbons, G. F., D. Wiggins, A. M. Brown and A. M. Hebbachi** (2004). "Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein." *Biochemical Society transactions* **32**(Pt 1): 59-64.
- Glue, P., J. W. Fang, R. Rouzier-Panis, C. Raffanel, R. Sabo, S. K. Gupta, M. Salfi and S. Jacobs** (2000). "Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group." *Clin Pharmacol Ther* **68**(5): 556-567.
- Goffard, A., N. Callens, B. Bartosch, C. Wychowski, F. L. Cosset, C. Montpellier and J. Dubuisson** (2005). "Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins." *J Virol* **79**(13): 8400-8409.
- Goldstein, J. L., M. S. Brown, R. G. Anderson, D. W. Russell and W. J. Schneider** (1985). "Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system." *Annu Rev Cell Biol* **1**: 1-39.
- Gondar, V., F. Molina-Jimenez, T. Hishiki, L. Garcia-Buey, G. Koutsoudakis, K. Shimotohno, I. Benedicto and P. L. Majano** (2015). "Apolipoprotein E, but Not Apolipoprotein B, Is Essential for Efficient Cell-to-Cell Transmission of Hepatitis C Virus." *J Virol* **89**(19): 9962-9973.
- Gondeau, C., P. Briolotti, F. Razafy, C. Duret, P. A. Rubbo, F. Helle, T. Reme, M. P. Ripault, J. Ducos, J. M. Fabre, J. Ramos, E. I. Pecheur, D. Larrey, P. Maurel and M. Daujat-Chavanieu** (2014). "In vitro infection of primary human hepatocytes by HCV-positive sera: insights on a highly relevant model." *Gut* **63**(9): 1490-1500.
- Gondeau, C., L. Pichard-Garcia and P. Maurel** (2009). "Cellular models for the screening and development of anti-hepatitis C virus agents." *Pharmacol Ther* **124**(1): 1-22.
- Goodman, J. M.** (2008). "The gregarious lipid droplet." *J Biol Chem* **283**(42): 28005-28009.
- Goossens, N. and F. Negro** (2014a). "Insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C virus infection." *Rev Recent Clin Trials* **9**(3): 204-209.
- Goossens, N. and F. Negro** (2014b). "Is genotype 3 of the hepatitis C virus the new villain?" *Hepatology* **59**(6): 2403-2412.

- Gosert, R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, K. Bienz and D. Moradpour** (2003). "Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons." *J Virol* **77**(9): 5487-5492.
- Gottwein, J. M., T. K. Scheel, T. B. Jensen, J. B. Lademann, J. C. Prentoe, M. L. Knudsen, A. M. Hoegh and J. Bukh** (2009). "Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs." *Hepatology* **49**(2): 364-377.
- Gouttenoire, J., P. Roingard, F. Penin and D. Moradpour** (2010). "Amphipathic alpha-helix AH2 is a major determinant for the oligomerization of hepatitis C virus nonstructural protein 4B." *J Virol* **84**(24): 12529-12537.
- Gower, E., C. Estes, S. Blach, K. Razavi-Shearer and H. Razavi** (2014). "Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection." *Journal of hepatology* **61**(1 Suppl): S45-57.
- Grahovac, B., J. Bingulac-Popovic, B. Vucelic, I. Hrstic, R. Ostojic, V. Drazic, M. Balija and D. Grgicevic** (2000). "Hypervariable region 1 of hepatitis C virus genome and response to interferon therapy." *Clin Chem Lab Med* **38**(9): 905-910.
- Grakoui, A., C. Wychowski, C. Lin, S. M. Feinstone and C. M. Rice** (1993). "Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products." *J Virol* **67**(3): 1385-1395.
- Guerra, J., M. Garenne, M. K. Mohamed and A. Fontanet** (2012). "HCV burden of infection in Egypt: results from a nationwide survey." *J Viral Hepat* **19**(8): 560-567.
- Guo, Y., K. R. Cordes, R. V. Farese, Jr. and T. C. Walther** (2009). "Lipid droplets at a glance." *J Cell Sci* **122**(Pt 6): 749-752.
- Gursky, O.** (2015). "Structural stability and functional remodeling of high-density lipoproteins." *FEBS Lett* **589**(19 Pt A): 2627-2639.
- Gusarova, V., J. Seo, M. L. Sullivan, S. C. Watkins, J. L. Brodsky and E. A. Fisher** (2007). "Golgi-associated maturation of very low density lipoproteins involves conformational changes in apolipoprotein B, but is not dependent on apolipoprotein E." *J Biol Chem* **282**(27): 19453-19462.
- Hagan, L. M., P. R. Wolpe and R. F. Schinazi** (2013). "Treatment as prevention and cure towards global eradication of hepatitis C virus." *Trends Microbiol* **21**(12): 625-633.
- Hagen, N., K. Bayer, K. Rosch and M. Schindler** (2014). "The intraviral protein interaction network of hepatitis C virus." *Mol Cell Proteomics* **13**(7): 1676-1689.
- Haid, S., A. Novodomska, J. Gentsch, C. Grethe, S. Geuenich, D. Bankwitz, P. Chhatwal, B. Jannack, T. Hennebelle, F. Bailleul, O. T. Keppler, M. Poenisch, R. Bartenschlager, C. Hernandez, M. Lemasson, A. R. Rosenberg, F. Wong-Staal, E. Davioud-Charvet and T. Pietschmann** (2012). "A plant-derived flavonoid inhibits entry of all HCV genotypes into human hepatocytes." *Gastroenterology* **143**(1): 213-222.
- Haid, S., T. Pietschmann and E. I. Pecheur** (2009). "Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles." *J Biol Chem* **284**(26): 17657-17667.
- Hamamoto, I., Y. Nishimura, T. Okamoto, H. Aizaki, M. Liu, Y. Mori, T. Abe, T. Suzuki, M. M. Lai, T. Miyamura, K. Moriishi and Y. Matsuura** (2005). "Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B." *J Virol* **79**(21): 13473-13482.
- Hamilton, G. A., S. L. Jolley, D. Gilbert, D. J. Coon, S. Barros and E. L. LeCluyse** (2001). "Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human

- hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions." *Cell Tissue Res* **306**(1): 85-99.
- Hamilton, R. L., J. S. Wong, C. M. Cham, L. B. Nielsen and S. G. Young** (1998). "Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency." *J Lipid Res* **39**(8): 1543-1557.
- Hanoulle, X., A. Badillo, J. M. Wieruszkeski, D. Verdegem, I. Landrieu, R. Bartenschlager, F. Penin and G. Lippens** (2009a). "Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilins A and B." *J Biol Chem* **284**(20): 13589-13601.
- Hanoulle, X., D. Verdegem, A. Badillo, J. M. Wieruszkeski, F. Penin and G. Lippens** (2009b). "Domain 3 of non-structural protein 5A from hepatitis C virus is natively unfolded." *Biochemical and biophysical research communications* **381**(4): 634-638.
- Harmsen, S., A. S. Koster, J. H. Beijnen, J. H. Schellens and I. Meijerman** (2008). "Comparison of two immortalized human cell lines to study nuclear receptor-mediated CYP3A4 induction." *Drug Metab Dispos* **36**(6): 1166-1171.
- Harris, H. J., C. Davis, J. G. Mullins, K. Hu, M. Goodall, M. J. Farquhar, C. J. Mee, K. McCaffrey, S. Young, H. Drummer, P. Balfe and J. A. McKeating** (2010). "Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry." *J Biol Chem* **285**(27): 21092-21102.
- Harris, H. J., M. J. Farquhar, C. J. Mee, C. Davis, G. M. Reynolds, A. Jennings, K. Hu, F. Yuan, H. Deng, S. G. Hubscher, J. H. Han, P. Balfe and J. A. McKeating** (2008). "CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry." *J Virol* **82**(10): 5007-5020.
- Heid, H. W., R. Moll, I. Schwetlick, H. R. Rackwitz and T. W. Keenan** (1998). "Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases." *Cell Tissue Res* **294**(2): 309-321.
- Helle, F., G. Vieyres, L. Elkrief, C. I. Popescu, C. Wychowski, V. Descamps, S. Castelain, P. Roingeard, G. Duverlie and J. Dubuisson** (2010). "Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions." *J Virol* **84**(22): 11905-11915.
- Henke, J. I., D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C. G. Schuttler, C. Fehr, C. Junemann and M. Niepmann** (2008). "microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA." *EMBO J* **27**(24): 3300-3310.
- Herker, E., C. Harris, C. Hernandez, A. Carpentier, K. Kaehlcke, A. R. Rosenberg, R. V. Farese, Jr. and M. Ott** (2010). "Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1." *Nat Med* **16**(11): 1295-1298.
- Herker, E. and M. Ott** (2011). "Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids." *Trends Endocrinol Metab* **22**(6): 241-248.
- Hewitt, N. J., M. J. Lechon, J. B. Houston, D. Hallifax, H. S. Brown, P. Maurel, J. G. Kenna, L. Gustavsson, C. Lohmann, C. Skonberg, A. Guillouzo, G. Tuschl, A. P. Li, E. LeCluyse, G. M. Groothuis and J. G. Hengstler** (2007). "Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies." *Drug Metab Rev* **39**(1): 159-234.
- Hezode, C., H. Fontaine, C. Dorival, F. Zoulim, D. Larrey, V. Canva, V. De Ledinghen, T. Poynard, D. Samuel, M. Bourliere, L. Alric, J. J. Raabe, J. P. Zarski, P. Marcellin, G. Riachi, P. H. Bernard, V. Loustaud-Ratti, O. Chazouilleres, A. Abergel, D. Guyader, S. Metivier, A. Tran, V. Di Martino, X. Causse, T. Dao, D.**

- Lucidarme, I. Portal, P. Cacoub, J. Gournay, V. Grando-Lemaire, et al.** (2014). "Effectiveness of telaprevir or boceprevir in treatment-experienced patients with HCV genotype 1 infection and cirrhosis." *Gastroenterology* **147**(1): 132-142 e134.
- Hijikata, M., H. Mizushima, T. Akagi, S. Mori, N. Kakiuchi, N. Kato, T. Tanaka, K. Kimura and K. Shimotohno** (1993a). "Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus." *J Virol* **67**(8): 4665-4675.
- Hijikata, M., Y. K. Shimizu, H. Kato, A. Iwamoto, J. W. Shih, H. J. Alter, R. H. Purcell and H. Yoshikura** (1993b). "Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes." *J Virol* **67**(4): 1953-1958.
- Hirano, M., S. Kaneko, T. Yamashita, H. Luo, W. Qin, Y. Shirota, T. Nomura, K. Kobayashi and S. Murakami** (2003). "Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B." *J Biol Chem* **278**(7): 5109-5115.
- Hirata, Y., K. Ikeda, M. Sudoh, Y. Tokunaga, A. Suzuki, L. Weng, M. Ohta, Y. Tobita, K. Okano, K. Ozeki, K. Kawasaki, T. Tsukuda, A. Katsume, Y. Aoki, T. Umehara, S. Sekiguchi, T. Toyoda, K. Shimotohno, T. Soga, M. Nishijima, R. Taguchi and M. Kohara** (2012). "Self-enhancement of hepatitis C virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis." *PLoS pathogens* **8**(8): e1002860.
- Hishikawa, D., T. Hashidate, T. Shimizu and H. Shindou** (2014). "Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells." *J Lipid Res* **55**(5): 799-807.
- Hofer, H., H. C. Bankl, F. Wrba, P. Steindl-Munda, M. Peck-Radosavljevic, C. Osterreicher, C. Mueller, A. Gangl and P. Ferenci** (2002). "Hepatocellular fat accumulation and low serum cholesterol in patients infected with HCV-3a." *Am J Gastroenterol* **97**(11): 2880-2885.
- Hollinger, F. B., G. L. Gitnick, R. D. Aach, W. Szmunn, J. W. Mosley, C. E. Stevens, R. L. Peters, J. M. Weiner, J. B. Werch and J. J. Lander** (1978). "Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group." *Intervirology* **10**(1): 60-68.
- Holtta-Vuori, M., K. Tanhuanpaa, W. Mobius, P. Somerharju and E. Ikonen** (2002). "Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11." *Mol Biol Cell* **13**(9): 3107-3122.
- Honda, A. and Y. Matsuzaki** (2011). "Cholesterol and chronic hepatitis C virus infection." *Hepatol Res* **41**(8): 697-710.
- Honda, M., M. R. Beard, L. H. Ping and S. M. Lemon** (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." *J Virol* **73**(2): 1165-1174.
- Hoofnagle, J. H., K. D. Mullen, D. B. Jones, V. Rustgi, A. Di Bisceglie, M. Peters, J. G. Waggoner, Y. Park and E. A. Jones** (1986). "Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report." *N Engl J Med* **315**(25): 1575-1578.
- Hope, R. G. and J. McLauchlan** (2000). "Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein." *J Gen Virol* **81**(Pt 8): 1913-1925.
- Horie, Y., A. Suzuki, E. Kataoka, T. Sasaki, K. Hamada, J. Sasaki, K. Mizuno, G. Hasegawa, H. Kishimoto, M. Iizuka, M. Naito, K. Enomoto, S. Watanabe, T. W. Mak and T. Nakano** (2004). "Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas." *J Clin Invest* **113**(12): 1774-1783.

- Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C. M. Rice and J. A. McKeating** (2003). "Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12): 7271-7276.
- Hsu, S. H., B. Wang, J. Kota, J. Yu, S. Costinean, H. Kutay, L. Yu, S. Bai, K. La Perle, R. R. Chivukula, H. Mao, M. Wei, K. R. Clark, J. R. Mendell, M. A. Caligiuri, S. T. Jacob, J. T. Mendell and K. Ghoshal** (2012). "Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver." *J Clin Invest* **122**(8): 2871-2883.
- Huang, H., Y. Chen and J. Ye** (2007a). "Inhibition of hepatitis C virus replication by peroxidation of arachidonate and restoration by vitamin E." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(47): 18666-18670.
- Huang, H., F. Sun, D. M. Owen, W. Li, Y. Chen, M. Gale, Jr. and J. Ye** (2007b). "Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14): 5848-5853.
- Hueging, K., M. Doepke, G. Vieyres, D. Bankwitz, A. Frentzen, J. Doerrbecker, F. Gumz, S. Haid, B. Wolk, L. Kaderali and T. Pietschmann** (2014). "Apolipoprotein E codetermines tissue tropism of hepatitis C virus and is crucial for viral cell-to-cell transmission by contributing to a postenvelopment step of assembly." *J Virol* **88**(3): 1433-1446.
- Hugle, T., F. Fehrmann, E. Bieck, M. Kohara, H. G. Krausslich, C. M. Rice, H. E. Blum and D. Moradpour** (2001). "The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein." *Virology* **284**(1): 70-81.
- Hulst, M. M., H. G. van Gennip, A. C. Vlot, E. Schooten, A. J. de Smit and R. J. Moormann** (2001). "Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and virulence." *J Virol* **75**(20): 9585-9595.
- Hussain, M. M., A. Bakillah, N. Nayak and G. S. Shelness** (1998). "Amino acids 430-570 in apolipoprotein B are critical for its binding to microsomal triglyceride transfer protein." *J Biol Chem* **273**(40): 25612-25615.
- Hussain, M. M., P. Rava, M. Walsh, M. Rana and J. Iqbal** (2012). "Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein." *Nutr Metab (Lond)* **9**: 14.
- Hussain, M. M., J. Shi and P. Dreizen** (2003). "Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly." *J Lipid Res* **44**(1): 22-32.
- Hussain, M. M., D. K. Strickland and A. Bakillah** (1999). "The mammalian low-density lipoprotein receptor family." *Annu Rev Nutr* **19**: 141-172.
- Icard, V., O. Diaz, C. Scholtes, L. Perrin-Cocon, C. Ramiere, R. Bartenschlager, F. Penin, V. Lotteau and P. Andre** (2009). "Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins." *PLoS one* **4**(1): e4233.
- Ikeda, K., S. Saitoh, Y. Arase, K. Chayama, Y. Suzuki, M. Kobayashi, A. Tsubota, I. Nakamura, N. Murashima, H. Kumada and M. Kawanishi** (1999). "Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: A long-term observation study of 1,643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis." *Hepatology* **29**(4): 1124-1130.
- Ikeda, M., M. Yi, K. Li and S. M. Lemon** (2002). "Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells." *J Virol* **76**(6): 2997-3006.

- Ito, T., J. Mukaigawa, J. Zuo, Y. Hirabayashi, K. Mitamura and K. Yasui** (1996). "Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus." *J Gen Virol* **77** (Pt 5): 1043-1054.
- Jensen, T. B., J. M. Gottwein, T. K. Scheel, A. M. Hoegh, J. Eugen-Olsen and J. Bukh** (2008). "Highly efficient JFH1-based cell-culture system for hepatitis C virus genotype 5a: failure of homologous neutralizing-antibody treatment to control infection." *J Infect Dis* **198**(12): 1756-1765.
- Jiang, J. and G. Luo** (2009). "Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles." *J Virol* **83**(24): 12680-12691.
- Jiang, J., X. Wu, H. Tang and G. Luo** (2013). "Apolipoprotein E mediates attachment of clinical hepatitis C virus to hepatocytes by binding to cell surface heparan sulfate proteoglycan receptors." *PloS one* **8**(7): e67982.
- Jirasko, V., R. Montserret, J. Y. Lee, J. Gouttenoire, D. Moradpour, F. Penin and R. Bartenschlager** (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**(12): e1001233.
- Jones, C. T., C. L. Murray, D. K. Eastman, J. Tassello and C. M. Rice** (2007). "Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus." *J Virol* **81**(16): 8374-8383.
- Jones, D. M., A. H. Patel, P. Targett-Adams and J. McLauchlan** (2009). "The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus." *J Virol* **83**(5): 2163-2177.
- Jopling, C. L., M. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon and P. Sarnow** (2005). "Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA." *Science* **309**(5740): 1577-1581.
- Kaito, M., S. Watanabe, K. Tsukiyama-Kohara, K. Yamaguchi, Y. Kobayashi, M. Konishi, M. Yokoi, S. Ishida, S. Suzuki and M. Kohara** (1994). "Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study." *J Gen Virol* **75** (Pt 7): 1755-1760.
- Kaneko, T., Y. Tanji, S. Satoh, M. Hijikata, S. Asabe, K. Kimura and K. Shimotohno** (1994). "Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome." *Biochemical and biophysical research communications* **205**(1): 320-326.
- Kanto, T., N. Hayashi, T. Takehara, H. Hagiwara, E. Mita, M. Naito, A. Kasahara, H. Fusamoto and T. Kamada** (1994). "Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation." *Hepatology* **19**(2): 296-302.
- Kapadia, S. B., H. Barth, T. Baumert, J. A. McKeating and F. V. Chisari** (2007). "Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I." *J Virol* **81**(1): 374-383.
- Kapadia, S. B. and F. V. Chisari** (2005). "Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(7): 2561-2566.
- Kapoor, A., P. Simmonds, G. Gerold, N. Qaisar, K. Jain, J. A. Henriquez, C. Firth, D. L. Hirschberg, C. M. Rice, S. Shields and W. I. Lipkin** (2011). "Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(28): 11608-11613.
- Kapoor, A., P. Simmonds, T. K. Scheel, B. Hjelle, J. M. Cullen, P. D. Burbelo, L. V. Chauhan, R. Duraisamy, M. Sanchez Leon, K. Jain, K. J. Vandegrift, C. H. Calisher, C. M. Rice and W. I. Lipkin** (2013). "Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses." *MBio* **4**(2): e00216-00213.

- Kassan, A., A. Herms, A. Fernandez-Vidal, M. Bosch, N. L. Schieber, B. J. Reddy, A. Fajardo, M. Gelabert-Baldrich, F. Tebar, C. Enrich, S. P. Gross, R. G. Parton and A. Pol** (2013). "Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains." *J Cell Biol* **203**(6): 985-1001.
- Kato, T., Y. Choi, G. Elmowalid, R. K. Sapp, H. Barth, A. Furusaka, S. Mishiro, T. Wakita, K. Krawczynski and T. J. Liang** (2008). "Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation." *Hepatology* **48**(3): 732-740.
- Kato, T., T. Date, M. Miyamoto, A. Furusaka, K. Tokushige, M. Mizokami and T. Wakita** (2003). "Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon." *Gastroenterology* **125**(6): 1808-1817.
- Kato, T., T. Matsumura, T. Heller, S. Saito, R. K. Sapp, K. Murthy, T. Wakita and T. J. Liang** (2007). "Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures." *J Virol* **81**(9): 4405-4411.
- Kaul, A., S. Stauffer, C. Berger, T. Pertel, J. Schmitt, S. Kallis, M. Zayas, V. Lohmann, J. Luban and R. Bartenschlager** (2009). "Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics." *PLoS pathogens* **5**(8): e1000546.
- Kempna, P., J. M. Zingg, R. Ricciarelli, M. Hierl, S. Saxena and A. Azzi** (2003). "Cloning of novel human SEC14p-like proteins: ligand binding and functional properties." *Free Radic Biol Med* **34**(11): 1458-1472.
- Kennedy, E. P. and S. B. Weiss** (1956). "The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides." *J Biol Chem* **222**(1): 193-214.
- Khan, A. G., J. Whidby, M. T. Miller, H. Scarborough, A. V. Zatorski, A. Cygan, A. A. Price, S. A. Yost, C. D. Bohannon, J. Jacob, A. Grakoui and J. Marcotrigiano** (2014). "Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2." *Nature* **509**(7500): 381-384.
- Khan, I., D. S. Katikaneni, Q. Han, L. Sanchez-Felipe, K. Hanada, R. L. Ambrose, J. M. Mackenzie and K. V. Konan** (2014). "Modulation of hepatitis C virus genome replication by glycosphingolipids and four-phosphate adaptor protein 2." *J Virol* **88**(21): 12276-12295.
- Khatun, I., S. Zeissig, J. Iqbal, M. Wang, D. Curiel, G. S. Shelness, R. S. Blumberg and M. M. Hussain** (2012). "Phospholipid transfer activity of microsomal triglyceride transfer protein produces apolipoprotein B and reduces hepatosteatosis while maintaining low plasma lipids in mice." *Hepatology* **55**(5): 1356-1368.
- Kim, D. W., Y. Gwack, J. H. Han and J. Choe** (1995). "C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity." *Biochemical and biophysical research communications* **215**(1): 160-166.
- Kim, S., T. Date, H. Yokokawa, T. Kono, H. Aizaki, P. Maurel, C. Gondeau and T. Wakita** (2014). "Development of hepatitis C virus genotype 3a cell culture system." *Hepatology* **60**(6): 1838-1850.
- Kim, S. J., J. H. Kim, Y. G. Kim, H. S. Lim and J. W. Oh** (2004). "Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation." *J Biol Chem* **279**(48): 50031-50041.
- Kimmel, A. R., D. L. Brasaemle, M. McAndrews-Hill, C. Sztalryd and C. Londos** (2010). "Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins." *J Lipid Res* **51**(3): 468-471.

- Kohlwein, S. D., M. Veenhuis and I. J. van der Klei** (2013). "Lipid droplets and peroxisomes: key players in cellular lipid homeostasis or a matter of fat--store 'em up or burn 'em down." *Genetics* **193**(1): 1-50.
- Kolupaeva, V. G., T. V. Pestova and C. U. Hellen** (2000). "An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus." *J Virol* **74**(14): 6242-6250.
- Kolykhalov, A. A., S. M. Feinstone and C. M. Rice** (1996). "Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA." *J Virol* **70**(6): 3363-3371.
- Kolykhalov, A. A., K. Mihalik, S. M. Feinstone and C. M. Rice** (2000). "Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo." *J Virol* **74**(4): 2046-2051.
- Kong, J., X. Deng, Z. Wang, J. Yang, Y. Zhang and J. Yu** (2009). "Hepatitis C virus F protein: A double-edged sword in the potential contribution of chronic inflammation to carcinogenesis." *Mol Med Rep* **2**(3): 461-469.
- Kong, L., E. Giang, T. Nieuwma, R. U. Kadam, K. E. Cogburn, Y. Hua, X. Dai, R. L. Stanfield, D. R. Burton, A. B. Ward, I. A. Wilson and M. Law** (2013). "Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure." *Science* **342**(6162): 1090-1094.
- Kontush, A., M. Lindahl, M. Lhomme, L. Calabresi, M. J. Chapman and W. S. Davidson** (2015). "Structure of HDL: particle subclasses and molecular components." *Handb Exp Pharmacol* **224**: 3-51.
- Kopp, M., C. L. Murray, C. T. Jones and C. M. Rice** (2010). "Genetic analysis of the carboxy-terminal region of the hepatitis C virus core protein." *J Virol* **84**(4): 1666-1673.
- Koutsoudakis, G., E. Herrmann, S. Kallis, R. Bartenschlager and T. Pietschmann** (2007). "The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells." *J Virol* **81**(2): 588-598.
- Koutsoudakis, G., A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann and R. Bartenschlager** (2006). "Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses." *J Virol* **80**(11): 5308-5320.
- Krahmer, N., Y. Guo, F. Wilfling, M. Hilger, S. Lingrell, K. Heger, H. W. Newman, M. Schmidt-Supprian, D. E. Vance, M. Mann, R. V. Farese, Jr. and T. C. Walther** (2011). "Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase." *Cell Metab* **14**(4): 504-515.
- Krey, T., J. d'Alayer, C. M. Kikuti, A. Saulnier, L. Damier-Piolle, I. Petitpas, D. X. Johansson, R. G. Tawar, B. Baron, B. Robert, P. England, M. A. Persson, A. Martin and F. A. Rey** (2010). "The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule." *PLoS pathogens* **6**(2): e1000762.
- Krieger, M.** (1999). "Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI." *Annual review of biochemistry* **68**: 523-558.
- Krieger, S. E., M. B. Zeisel, C. Davis, C. Thumann, H. J. Harris, E. K. Schnober, C. Mee, E. Soulier, C. Royer, M. Lambotin, F. Grunert, V. L. Dao Thi, M. Dreux, F. L. Cosset, J. A. McKeating, C. Schuster and T. F. Baumert** (2010). "Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations." *Hepatology* **51**(4): 1144-1157.
- Krul, E. S., M. J. Tikkanen, T. G. Cole, J. M. Davie and G. Schonfeld** (1985). "Roles of apolipoproteins B and E in the cellular binding of very low density lipoproteins." *J Clin Invest* **75**(2): 361-369.

- Kuerschner, L., C. Moessinger and C. Thiele** (2008). "Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets." *Traffic* **9**(3): 338-352.
- Kuipers, F., M. C. Jong, Y. Lin, M. Eck, R. Havinga, V. Bloks, H. J. Verkade, M. H. Hofker, H. Moshage, T. J. Berkel, R. J. Vonk and L. M. Havekes** (1997). "Impaired secretion of very low density lipoprotein-triglycerides by apolipoprotein E- deficient mouse hepatocytes." *J Clin Invest* **100**(11): 2915-2922.
- Kulinski, A., S. Rustaeus and J. E. Vance** (2002). "Microsomal triacylglycerol transfer protein is required for luminal accretion of triacylglycerol not associated with ApoB, as well as for ApoB lipidation." *J Biol Chem* **277**(35): 31516-31525.
- Kumar, D., G. C. Farrell, C. Fung and J. George** (2002). "Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes: Reversal of hepatic steatosis after sustained therapeutic response." *Hepatology* **36**(5): 1266-1272.
- Lam, A. M. and D. N. Frick** (2006). "Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase." *J Virol* **80**(1): 404-411.
- Lamarre, D., P. C. Anderson, M. Bailey, P. Beaulieu, G. Bolger, P. Bonneau, M. Bos, D. R. Cameron, M. Cartier, M. G. Cordingley, A. M. Faucher, N. Goudreau, S. H. Kawai, G. Kukolj, L. Lagace, S. R. LaPlante, H. Narjes, M. A. Poupard, J. Rancourt, R. E. Sentjens, R. St George, B. Simoneau, G. Steinmann, D. Thibeault, Y. S. Tsantrizos, S. M. Weldon, C. L. Yong and M. Llinas-Brunet** (2003). "An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus." *Nature* **426**(6963): 186-189.
- Lambert, J. E., V. G. Bain, E. A. Ryan, A. B. Thomson and M. T. Clandinin** (2013). "Elevated lipogenesis and diminished cholesterol synthesis in patients with hepatitis C viral infection compared to healthy humans." *Hepatology* **57**(5): 1697-1704.
- Lan, S., H. Wang, H. Jiang, H. Mao, X. Liu, X. Zhang, Y. Hu, L. Xiang and Z. Yuan** (2003). "Direct interaction between alpha-actinin and hepatitis C virus NS5B." *FEBS Lett* **554**(3): 289-294.
- Lands, W. E.** (1958). "Metabolism of glycerolipides; a comparison of lecithin and triglyceride synthesis." *J Biol Chem* **231**(2): 883-888.
- Lands, W. E. and I. Merkl** (1963). "Metabolism of glycerolipids. III. Reactivity of various acyl esters of coenzyme A with alpha'-acylglycerophosphorylcholine, and positional specificities in lecithin synthesis." *J Biol Chem* **238**: 898-904.
- Lavanchy, D.** (2011). "Evolving epidemiology of hepatitis C virus." *Clin Microbiol Infect* **17**(2): 107-115.
- Lavillette, D., B. Bartosch, D. Nourrisson, G. Verney, F. L. Cosset, F. Penin and E. I. Pecheur** (2006). "Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes." *J Biol Chem* **281**(7): 3909-3917.
- Lavillette, D., A. W. Tarr, C. Voisset, P. Donot, B. Bartosch, C. Bain, A. H. Patel, J. Dubuisson, J. K. Ball and F. L. Cosset** (2005). "Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus." *Hepatology* **41**(2): 265-274.
- Lawitz, E., M. S. Sulkowski, R. Ghalib, M. Rodriguez-Torres, Z. M. Younossi, A. Corregidor, E. DeJesus, B. Pearlman, M. Rabinovitz, N. Gitlin, J. K. Lim, P. J. Pockros, J. D. Scott, B. Fevery, T. Lambrecht, S. Ouwerkerk-Mahadevan, K. Callewaert, W. T. Symonds, G. Picchio, K. L. Lindsay, M. Beumont and I. M. Jacobson** (2014). "Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naive patients: the COSMOS randomised study." *Lancet* **384**(9956): 1756-1765.

- Leavens, K. F. and M. J. Birnbaum** (2011). "Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **46**(3): 200-215.
- Lee, J. Y., E. G. Acosta, I. K. Stoeck, G. Long, M. S. Hiet, B. Mueller, O. T. Fackler, S. Kallis and R. Bartenschlager** (2014). "Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins." *J Virol* **88**(21): 12422-12437.
- Lee, S. R., G. D. Yearwood, G. B. Guillon, L. A. Kurtz, M. Fischl, T. Friel, C. A. Berne and K. W. Kardos** (2010). "Evaluation of a rapid, point-of-care test device for the diagnosis of hepatitis C infection." *J Clin Virol* **48**(1): 15-17.
- Lefevre, M., D. J. Felmler, M. Parnot, T. F. Baumert and C. Schuster** (2014). "Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E." *PloS one* **9**(4): e95550.
- Lehner, R., J. Lian and A. D. Quiroga** (2012). "Luminal lipid metabolism: implications for lipoprotein assembly." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**(5): 1087-1093.
- Leikin, S., M. M. Kozlov, N. L. Fuller and R. P. Rand** (1996). "Measured effects of diacylglycerol on structural and elastic properties of phospholipid membranes." *Biophys J* **71**(5): 2623-2632.
- Lemberg, M. K. and B. Martoglio** (2002). "Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis." *Mol Cell* **10**(4): 735-744.
- Lerat, H., M. Honda, M. R. Beard, K. Loesch, J. Sun, Y. Yang, M. Okuda, R. Gosert, S. Y. Xiao, S. A. Weinman and S. M. Lemon** (2002). "Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus." *Gastroenterology* **122**(2): 352-365.
- Leslie, N. R. and M. Foti** (2011). "Non-genomic loss of PTEN function in cancer: not in my genes." *Trends Pharmacol Sci* **32**(3): 131-140.
- Li, Q., V. Pene, S. Krishnamurthy, H. Cha and T. J. Liang** (2013). "Hepatitis C virus infection activates an innate pathway involving IKK-alpha in lipogenesis and viral assembly." *Nat Med* **19**(6): 722-729.
- Li, S., L. Ye, X. Yu, B. Xu, K. Li, X. Zhu, H. Liu, X. Wu and L. Kong** (2009). "Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF-kappaB activation." *Virology* **391**(2): 257-264.
- Li, X., H. Jiang, L. Qu, W. Yao, H. Cai, L. Chen and T. Peng** (2014). "Hepatocyte nuclear factor 4alpha and downstream secreted phospholipase A2 GXIIB regulate production of infectious hepatitis C virus." *J Virol* **88**(1): 612-627.
- Li, X., J. Ye, L. Zhou, W. Gu, E. A. Fisher and P. Li** (2012). "Opposing roles of cell death-inducing DFF45-like effector B and perilipin 2 in controlling hepatic VLDL lipidation." *J Lipid Res* **53**(9): 1877-1889.
- Li, Y. P., S. Ramirez, S. B. Jensen, R. H. Purcell, J. M. Gottwein and J. Bukh** (2012). "Highly efficient full-length hepatitis C virus genotype 1 (strain TN) infectious culture system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(48): 19757-19762.
- Li, Y. P., S. Ramirez, L. Mikkelsen and J. Bukh** (2015). "Efficient infectious cell culture systems of the hepatitis C virus (HCV) prototype strains HCV-1 and H77." *J Virol* **89**(1): 811-823.
- Li, Z., L. B. Agellon, T. M. Allen, M. Umeda, L. Jewell, A. Mason and D. E. Vance** (2006). "The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis." *Cell Metab* **3**(5): 321-331.
- Li, Z., T. Ding, X. Pan, Y. Li, R. Li, P. E. Sanders, M. S. Kuo, M. M. Hussain, G. Cao and X. C. Jiang** (2012). "Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 knockdown-mediated liver lysophosphatidylcholine accumulation promotes very low density

- lipoprotein production by enhancing microsomal triglyceride transfer protein expression." *J Biol Chem* **287**(24): 20122-20131.
- Liang, J. and H. N. Ginsberg** (2001). "Microsomal triglyceride transfer protein binding and lipid transfer activities are independent of each other, but both are required for secretion of apolipoprotein B lipoproteins from liver cells." *J Biol Chem* **276**(30): 28606-28612.
- Liang, J. J., P. Oelkers, C. Guo, P. C. Chu, J. L. Dixon, H. N. Ginsberg and S. L. Sturley** (2004). "Overexpression of human diacylglycerol acyltransferase 1, acyl-coa:cholesterol acyltransferase 1, or acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins in McA-RH7777 cells." *J Biol Chem* **279**(43): 44938-44944.
- Liang, Y., T. Shilagard, S. Y. Xiao, N. Snyder, D. Lau, L. Cicalese, H. Weiss, G. Vargas and S. M. Lemon** (2009). "Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy." *Gastroenterology* **137**(4): 1448-1458.
- Lieberman, M., A. D. Marks and C. M. Smith** (2009). "Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach." Philadelphia, *Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins*.
- Liefhebber, J. M., C. V. Hague, Q. Zhang, M. J. Wakelam and J. McLauchlan** (2014). "Modulation of triglyceride and cholesterol ester synthesis impairs assembly of infectious hepatitis C virus." *J Biol Chem* **289**(31): 21276-21288.
- Lin, C., B. D. Lindenbach, B. M. Pragai, D. W. McCourt and C. M. Rice** (1994). "Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini." *J Virol* **68**(8): 5063-5073.
- Lin, C. C., P. Tsai, H. Y. Sun, M. C. Hsu, J. C. Lee, I. C. Wu, C. W. Tsao, T. T. Chang and K. C. Young** (2014). "Apolipoprotein J, a glucose-upregulated molecular chaperone, stabilizes core and NS5A to promote infectious hepatitis C virus virion production." *Journal of hepatology* **61**(5): 984-993.
- Lin, L. T., T. Y. Chen, S. C. Lin, C. Y. Chung, T. C. Lin, G. H. Wang, R. Anderson, C. C. Lin and C. D. Richardson** (2013). "Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry." *BMC Microbiol* **13**: 187.
- Lindenbach, B. D., P. Meuleman, A. Ploss, T. Vanwolleghem, A. J. Syder, J. A. McKeating, R. E. Lanford, S. M. Feinstone, M. E. Major, G. Leroux-Roels and C. M. Rice** (2006). "Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3805-3809.
- Lindenbach, B. D., B. M. Pragai, R. Montserret, R. K. Beran, A. M. Pyle, F. Penin and C. M. Rice** (2007). "The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication." *J Virol* **81**(17): 8905-8918.
- Liu, P., R. Bartz, J. K. Zehmer, Y. S. Ying, M. Zhu, G. Serrero and R. G. Anderson** (2007). "Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets." *Biochimica et biophysica acta* **1773**(6): 784-793.
- Liu, S., W. Kuo, W. Yang, W. Liu, G. A. Gibson, K. Dorko, S. C. Watkins, S. C. Strom and T. Wang** (2010). "The second extracellular loop dictates Occludin-mediated HCV entry." *Virology* **407**(1): 160-170.
- Liu, S., W. Yang, L. Shen, J. R. Turner, C. B. Coyne and T. Wang** (2009). "Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection." *J Virol* **83**(4): 2011-2014.

- Liu, X., T. Wang, T. Wakita and W. Yang** (2010). "Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells." *Virology* **398**(1): 57-67.
- Liu, Z., Y. Tian, K. Machida, M. M. Lai, G. Luo, S. K. Fong and J. H. Ou** (2012). "Transient activation of the PI3K-AKT pathway by hepatitis C virus to enhance viral entry." *J Biol Chem* **287**(50): 41922-41930.
- Lohmann, V.** (2013). "Hepatitis C virus RNA replication." *Curr Top Microbiol Immunol* **369**: 167-198.
- Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann and R. Bartenschlager** (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." *Science* **285**(5424): 110-113.
- Love, R. A., O. Brodsky, M. J. Hickey, P. A. Wells and C. N. Cronin** (2009). "Crystal structure of a novel dimeric form of NS5A domain I protein from hepatitis C virus." *J Virol* **83**(9): 4395-4403.
- Lozano, R., M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, V. Aboyans, J. Abraham, T. Adair, R. Aggarwal, S. Y. Ahn, M. Alvarado, H. R. Anderson, L. M. Anderson, K. G. Andrews, C. Atkinson, L. M. Baddour, S. Barker-Collo, D. H. Bartels, M. L. Bell, E. J. Benjamin, D. Bennett, K. Bhalla, B. Bikbov, A. Bin Abdulhak, G. Birbeck, F. Blyth, I. Bolliger, S. Boufous, C. Bucello, M. Burch, et al.** (2012). "Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet* **380**(9859): 2095-2128.
- Lukavsky, P. J., I. Kim, G. A. Otto and J. D. Puglisi** (2003). "Structure of HCV IRES domain II determined by NMR." *Nat Struct Biol* **10**(12): 1033-1038.
- Lundin, M., M. Monne, A. Widell, G. Von Heijne and M. A. Persson** (2003). "Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B." *J Virol* **77**(9): 5428-5438.
- Lupberger, J., M. B. Zeisel, F. Xiao, C. Thumann, I. Fofana, L. Zona, C. Davis, C. J. Mee, M. Turek, S. Gorke, C. Royer, B. Fischer, M. N. Zahid, D. Lavillette, J. Fresquet, F. L. Cosset, S. M. Rothenberg, T. Pietschmann, A. H. Patel, P. Pessaux, M. Doffoel, W. Raffelsberger, O. Poch, J. A. McKeating, L. Brino and T. F. Baumert** (2011). "EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy." *Nat Med* **17**(5): 589-595.
- Lyn, R. K., R. Singaravelu, S. Kargman, S. O'Hara, H. Chan, R. Oballa, Z. Huang, D. M. Jones, A. Ridsdale, R. S. Russell, A. W. Partridge and J. P. Pezacki** (2014). "Stearoyl-CoA desaturase inhibition blocks formation of hepatitis C virus-induced specialized membranes." *Sci Rep* **4**: 4549.
- Ma, Y., M. Anantpadma, J. M. Timpe, S. Shanmugam, S. M. Singh, S. M. Lemon and M. Yi** (2011). "Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins." *J Virol* **85**(1): 86-97.
- MacDonald, J. I. and H. Sprecher** (1991). "Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells." *Biochimica et biophysica acta* **1084**(2): 105-121.
- Madan, V. and R. Bartenschlager** (2015). "Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroporin." *Viruses* **7**(8): 4461-4481.
- Magnusson, B., L. Asp, P. Bostrom, M. Ruiz, P. Stillemark-Billton, D. Linden, J. Boren and S. O. Olofsson** (2006). "Adipocyte differentiation-related protein promotes fatty acid storage in cytosolic triglycerides and inhibits secretion of very low-density lipoproteins." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(7): 1566-1571.
- Maillard, P., T. Huby, U. Andreo, M. Moreau, J. Chapman and A. Budkowska** (2006). "The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1

- is mediated by ApoB-containing lipoproteins." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**(6): 735-737.
- Majeau, N., R. Fromentin, C. Savard, M. Duval, M. J. Tremblay and D. Leclerc** (2009). "Palmitoylation of hepatitis C virus core protein is important for virion production." *J Biol Chem* **284**(49): 33915-33925.
- Manchekar, M., Y. Liu, Z. Sun, P. E. Richardson and N. Dashti** (2015). "Phospholipid transfer protein plays a major role in the initiation of apolipoprotein B-containing lipoprotein assembly in mouse primary hepatocytes." *J Biol Chem* **290**(13): 8196-8205.
- Mancone, C., C. Steindler, L. Santangelo, G. Simonte, C. Vlassi, M. A. Longo, G. D'Offizi, C. Di Giacomo, L. P. Pucillo, L. Amicone, M. Tripodi and T. Alonzi** (2011). "Hepatitis C virus production requires apolipoprotein A-I and affects its association with nascent low-density lipoproteins." *Gut* **60**(3): 378-386.
- Manns, M. P., J. G. McHutchison, S. C. Gordon, V. K. Rustgi, M. Shiffman, R. Reindollar, Z. D. Goodman, K. Koury, M. Ling and J. K. Albrecht** (2001). "Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial." *Lancet* **358**(9286): 958-965.
- Mansilla, F., K. A. da Costa, S. Wang, M. Kruhoffer, T. M. Lewin, T. F. Orntoft, R. A. Coleman and K. Birkenkamp-Demtroder** (2009). "Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) overexpression in human colorectal cancer." *J Mol Med (Berl)* **87**(1): 85-97.
- Marchesan, D., M. Rutberg, L. Andersson, L. Asp, T. Larsson, J. Boren, B. R. Johansson and S. O. Olofsson** (2003). "A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system." *J Biol Chem* **278**(29): 27293-27300.
- Marcinkiewicz, A., D. Gauthier, A. Garcia and D. L. Brasaemle** (2006). "The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion." *J Biol Chem* **281**(17): 11901-11909.
- Martell, M., J. I. Esteban, J. Quer, J. Genesca, A. Weiner, R. Esteban, J. Guardia and J. Gomez** (1992). "Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution." *J Virol* **66**(5): 3225-3229.
- Martin, D. N. and S. L. Uprichard** (2013). "Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(26): 10777-10782.
- Martin, S., K. Driessen, S. J. Nixon, M. Zerial and R. G. Parton** (2005). "Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism." *J Biol Chem* **280**(51): 42325-42335.
- Mas Marques, A., T. Mueller, J. Welke, S. Taube, C. Sarrazin, M. Wiese, J. Halangk, H. Witt, G. Ahlenstiel, U. Spengler, U. Goebel, E. Schott, V. Weich, B. Schlosser, H. E. Wasmuth, F. Lammert, T. Berg and E. Schreier** (2009). "Low-density lipoprotein receptor variants are associated with spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection." *Infect Genet Evol* **9**(5): 847-852.
- Masaki, T., S. Matsunaga, H. Takahashi, K. Nakashima, Y. Kimura, M. Ito, M. Matsuda, A. Murayama, T. Kato, H. Hirano, Y. Endo, S. M. Lemon, T. Wakita, T. Sawasaki and T. Suzuki** (2014). "Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I-alpha in infectious virus production." *J Virol* **88**(13): 7541-7555.
- Masaki, T., R. Suzuki, K. Murakami, H. Aizaki, K. Ishii, A. Murayama, T. Date, Y. Matsuura, T. Miyamura, T. Wakita and T. Suzuki** (2008). "Interaction of hepatitis C

- virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles." *J Virol* **82**(16): 7964-7976.
- Mashek, D. G., S. A. Khan, A. Sathyanarayan, J. M. Ploeger and M. P. Franklin** (2015). "Hepatic lipid droplet biology: Getting to the root of fatty liver." *Hepatology* **62**(3): 964-967.
- Matsubara, T., N. Tanaka, M. Sato, D. W. Kang, K. W. Krausz, K. C. Flanders, K. Ikeda, H. Luecke, L. M. Wakefield and F. J. Gonzalez** (2012). "TGF-beta-SMAD3 signaling mediates hepatic bile acid and phospholipid metabolism following lithocholic acid-induced liver injury." *J Lipid Res* **53**(12): 2698-2707.
- Matto, M., E. H. Sklan, N. David, N. Melamed-Book, J. E. Casanova, J. S. Glenn and B. Aroeti** (2011). "Role for ADP ribosylation factor 1 in the regulation of hepatitis C virus replication." *J Virol* **85**(2): 946-956.
- Maugeais, C., U. J. Tietge, K. Tsukamoto, J. M. Glick and D. J. Rader** (2000). "Hepatic apolipoprotein E expression promotes very low density lipoprotein-apolipoprotein B production in vivo in mice." *J Lipid Res* **41**(10): 1673-1679.
- McLauchlan, J.** (2000). "Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes." *J Viral Hepat* **7**(1): 2-14.
- McLauchlan, J., M. K. Lemberg, G. Hope and B. Martoglio** (2002). "Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets." *EMBO J* **21**(15): 3980-3988.
- McMullan, L. K., A. Grakoui, M. J. Evans, K. Mihalik, M. Puig, A. D. Branch, S. M. Feinstone and C. M. Rice** (2007). "Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(8): 2879-2884.
- Mee, C. J., J. Grove, H. J. Harris, K. Hu, P. Balfe and J. A. McKeating** (2008). "Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry." *J Virol* **82**(1): 461-470.
- Mee, C. J., H. J. Harris, M. J. Farquhar, G. Wilson, G. Reynolds, C. Davis, I. S. C. van, P. Balfe and J. A. McKeating** (2009). "Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells." *J Virol* **83**(12): 6211-6221.
- Meertens, L., C. Bertaux and T. Dragic** (2006). "Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles." *J Virol* **80**(23): 11571-11578.
- Meex, S. J., U. Andreo, J. D. Sparks and E. A. Fisher** (2011). "Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion?" *J Lipid Res* **52**(1): 152-158.
- Meffre, C., Y. Le Strat, E. Delarocque-Astagneau, F. Dubois, D. Antona, J. M. Lemasson, J. Warszawski, J. Steinmetz, D. Coste, J. F. Meyer, S. Leiser, J. P. Giordanella, R. Gueguen and J. C. Desenclos** (2010). "Prevalence of hepatitis B and hepatitis C virus infections in France in 2004: social factors are important predictors after adjusting for known risk factors." *J Med Virol* **82**(4): 546-555.
- Menzel, N., W. Fischl, K. Hueging, D. Bankwitz, A. Frentzen, S. Haid, J. Gentsch, L. Kaderali, R. Bartenschlager and T. Pietschmann** (2012). "MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles." *PLoS pathogens* **8**(7): e1002829.
- Mercer, D. F., D. E. Schiller, J. F. Elliott, D. N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, W. R. Addison, K. P. Fischer, T. A. Churchill, J. R. Lakey, D. L. Tyrrell and N. M. Kneteman** (2001). "Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers." *Nat Med* **7**(8): 927-933.
- Merz, A., G. Long, M. S. Hiet, B. Brugger, P. Chlanda, P. Andre, F. Wieland, J. Krijnse-Locker and R. Bartenschlager** (2011). "Biochemical and morphological properties of

- hepatitis C virus particles and determination of their lipidome." *J Biol Chem.* **286**(4): 3018-3032.
- Mesmin, B., J. Bigay, J. Moser von Filseck, S. Lacas-Gervais, G. Drin and B. Antony** (2013). "A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP." *Cell* **155**(4): 830-843.
- Messina, J. P., I. Humphreys, A. Flaxman, A. Brown, G. S. Cooke, O. G. Pybus and E. Barnes** (2015). "Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes." *Hepatology* **61**(1): 77-87.
- Meuleman, P. and G. Leroux-Roels** (2008). "The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV." *Antiviral Res* **80**(3): 231-238.
- Meuleman, P., L. Libbrecht, R. De Vos, B. de Hemptinne, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, T. Roskams and G. Leroux-Roels** (2005). "Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera." *Hepatology* **41**(4): 847-856.
- Meunier, J. C., R. E. Engle, K. Faulk, M. Zhao, B. Bartosch, H. Alter, S. U. Emerson, F. L. Cosset, R. H. Purcell and J. Bukh** (2005). "Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(12): 4560-4565.
- Meunier, J. C., R. S. Russell, R. E. Engle, K. N. Faulk, R. H. Purcell and S. U. Emerson** (2008). "Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus." *J Virol* **82**(19): 9647-9656.
- Micallef, J. M., J. M. Kaldor and G. J. Dore** (2006). "Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies." *J Viral Hepat* **13**(1): 34-41.
- Mihm, S., A. Fayyazi, H. Hartmann and G. Ramadori** (1997). "Analysis of histopathological manifestations of chronic hepatitis C virus infection with respect to virus genotype." *Hepatology* **25**(3): 735-739.
- Ministère de la santé.** (2014). "Mettre l'innovation au service des malades rapidement et au prix juste (fixation du prix de la spécialité Sovaldi)." from <http://www.sante.gouv.fr/mettre-l-innovation-au-service-des-malades-rapidement-et-au-prix-juste-fixation-du-prix-de-la-specialite-sovaldi.html>.
- Mirandola, S., D. Bowman, M. M. Hussain and A. Alberti** (2010). "Hepatic steatosis in hepatitis C is a storage disease due to HCV interaction with microsomal triglyceride transfer protein (MTP)." *Nutr Metab (Lond)* **7**: 13.
- Mirandola, S., S. Realdon, J. Iqbal, M. Gerotto, F. Dal Pero, G. Bortoletto, M. Marcolongo, A. Varo, C. Datz, M. M. Hussain and A. Alberti** (2006). "Liver microsomal triglyceride transfer protein is involved in hepatitis C liver steatosis." *Gastroenterology* **130**(6): 1661-1669.
- Mitchell, D. M., M. Zhou, R. Pariyarath, H. Wang, J. D. Aitchison, H. N. Ginsberg and E. A. Fisher** (1998). "Apoprotein B100 has a prolonged interaction with the translocon during which its lipidation and translocation change from dependence on the microsomal triglyceride transfer protein to independence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14733-14738.
- Miyanari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata and K. Shimotohno** (2007). "The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production." *Nat Cell Biol* **9**(9): 1089-1097.

- Moessinger, C., K. Klizaite, A. Steinhagen, J. Philippou-Massier, A. Shevchenko, M. Hoch, C. S. Ejsing and C. Thiele** (2014). "Two different pathways of phosphatidylcholine synthesis, the Kennedy Pathway and the Lands Cycle, differentially regulate cellular triacylglycerol storage." *BMC cell biology* **15**: 43.
- Moessinger, C., L. Kuerschner, J. Spandl, A. Shevchenko and C. Thiele** (2011). "Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine." *J Biol Chem.* **286**(24): 21330-21339.
- Mohd Hanafiah, K., J. Groeger, A. D. Flaxman and S. T. Wiersma** (2013). "Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence." *Hepatology* **57**(4): 1333-1342.
- Mokashi, V., D. K. Singh and T. D. Porter** (2005). "Supernatant protein factor stimulates HMG-CoA reductase in cell culture and in vitro." *Arch Biochem Biophys* **433**(2): 474-480.
- Molina, S., V. Castet, C. Fournier-Wirth, L. Pichard-Garcia, R. Avner, D. Harats, J. Roitelman, R. Barbaras, P. Graber, P. Ghera, M. Smolarsky, A. Funaro, F. Malavasi, D. Larrey, J. Coste, J. M. Fabre, A. Sa-Cunha and P. Maurel** (2007). "The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus." *Journal of hepatology* **46**(3): 411-419.
- Molina, S., V. Castet, L. Pichard-Garcia, C. Wychowski, E. Meurs, J. M. Pascussi, C. Sureau, J. M. Fabre, A. Sacunha, D. Larrey, J. Dubuisson, J. Coste, J. McKeating, P. Maurel and C. Fournier-Wirth** (2008). "Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent." *J Virol* **82**(1): 569-574.
- Moradpour, D., V. Brass, E. Bieck, P. Friebe, R. Gosert, H. E. Blum, R. Bartenschlager, F. Penin and V. Lohmann** (2004a). "Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication." *J Virol* **78**(23): 13278-13284.
- Moradpour, D., C. Englert, T. Wakita and J. R. Wands** (1996). "Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein." *Virology* **222**(1): 51-63.
- Moradpour, D., M. J. Evans, R. Gosert, Z. Yuan, H. E. Blum, S. P. Goff, B. D. Lindenbach and C. M. Rice** (2004b). "Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes." *J Virol* **78**(14): 7400-7409.
- Moradpour, D. and F. Penin** (2013). "Hepatitis C virus proteins: from structure to function." *Curr Top Microbiol Immunol* **369**: 113-142.
- Moreno, C., P. Deltenre, J. M. Pawlotsky, J. Henrion, M. Adler and P. Mathurin** (2010). "Shortened treatment duration in treatment-naïve genotype 1 HCV patients with rapid virological response: a meta-analysis." *Journal of hepatology* **52**(1): 25-31.
- Morita, Y., T. Sakaguchi, K. Ikegami, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, V. T. Hang, H. Tanaka, T. Harada, Y. Shibasaki, A. Suzuki, K. Fukumoto, K. Inaba, M. Murakami, M. Setou and H. Konno** (2013). "Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression." *Journal of hepatology* **59**(2): 292-299.
- Murakami, M., Y. Taketomi, Y. Miki, H. Sato, T. Hirabayashi and K. Yamamoto** (2011). "Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans." *Prog Lipid Res* **50**(2): 152-192.

- Murphy, D. G., E. Sablon, J. Chamberland, E. Fournier, R. Dandavino and C. L. Tremblay** (2015). "Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa." *Journal of clinical microbiology* **53**(3): 967-972.
- Murphy, S., S. Martin and R. G. Parton** (2009). "Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats." *Biochimica et biophysica acta* **1791**(6): 441-447.
- Nahmias, Y., J. Goldwasser, M. Casali, D. van Poll, T. Wakita, R. T. Chung and M. L. Yarmush** (2008). "Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin." *Hepatology* **47**(5): 1437-1445.
- Nakai, K., T. Okamoto, T. Kimura-Someya, K. Ishii, C. K. Lim, H. Tani, E. Matsuo, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, T. Miyamura, J. H. Nunberg, K. Moriishi and Y. Matsuura** (2006). "Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein." *J Virol* **80**(22): 11265-11273.
- Nanjundan, M. and F. Possmayer** (2003). "Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**(1): L1-23.
- Nasheri, N., M. Joyce, Y. Rouleau, P. Yang, S. Yao, D. L. Tyrrell and J. P. Pezacki** (2013). "Modulation of fatty acid synthase enzyme activity and expression during hepatitis C virus replication." *Chem Biol* **20**(4): 570-582.
- Negro, F.** (2010). "Abnormalities of lipid metabolism in hepatitis C virus infection." *Gut* **59**(9): 1279-1287.
- Negro, F.** (2011). "Mechanisms of hepatitis C virus-related insulin resistance." *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **35**(5): 358-363.
- Negro, F.** (2014). "Nouveaux antiviraux actifs contre le virus de l'hépatite C." *Forum Med Suisse* **2014/29-30 (14)**: 550-552.
- Negro, F. and A. J. Sanyal** (2009). "Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: clinical and pathogenic data." *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **29 Suppl 2**: 26-37.
- Nguyen, L. N., Y. S. Lim, L. V. Pham, H. Y. Shin, Y. S. Kim and S. B. Hwang** (2014). "Stearoyl coenzyme A desaturase 1 is associated with hepatitis C virus replication complex and regulates viral replication." *J Virol* **88**(21): 12311-12325.
- Nielsen, S. U., M. F. Bassendine, A. D. Burt, C. Martin, W. Pumeechockchai and G. L. Toms** (2006). "Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients." *J Virol* **80**(5): 2418-2428.
- Nielsen, S. U., M. F. Bassendine, C. Martin, D. Lowther, P. J. Purcell, B. J. King, D. Neely and G. L. Toms** (2008). "Characterization of hepatitis C RNA-containing particles from human liver by density and size." *J Gen Virol.* **89**(Pt 10): 2507-2517.
- NIH, C.** (2002). "National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002." *Hepatology* **36**(5 Suppl 1): S3-20.
- Ohsaki, Y., J. Cheng, M. Suzuki, A. Fujita and T. Fujimoto** (2008). "Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100." *J Cell Sci* **121**(Pt 14): 2415-2422.
- Ohsaki, Y., T. Maeda, M. Maeda, K. Tauchi-Sato and T. Fujimoto** (2006). "Recruitment of TIP47 to lipid droplets is controlled by the putative hydrophobic cleft." *Biochemical and biophysical research communications* **347**(1): 279-287.
- Okuda, M., K. Li, M. R. Beard, L. A. Showalter, F. Scholle, S. M. Lemon and S. A. Weinman** (2002). "Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein." *Gastroenterology* **122**(2): 366-375.

- Okumura, T.** (2011). "Role of lipid droplet proteins in liver steatosis." *J Physiol Biochem* **67**(4): 629-636.
- Olayioye, M. A., R. M. Neve, H. A. Lane and N. E. Hynes** (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." *EMBO J* **19**(13): 3159-3167.
- Olmstead, A. D., W. Knecht, I. Lazarov, S. B. Dixit and F. Jean** (2012). "Human subtilase SKI-1/S1P is a master regulator of the HCV Lifecycle and a potential host cell target for developing indirect-acting antiviral agents." *PLoS pathogens* **8**(1): e1002468.
- Olofsson, S. O. and J. Boren** (2012). "Apolipoprotein B secretory regulation by degradation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**(6): 1334-1338.
- Olofsson, S. O., O. Wiklund and J. Boren** (2007). "Apolipoproteins A-I and B: biosynthesis, role in the development of atherosclerosis and targets for intervention against cardiovascular disease." *Vasc Health Risk Manag* **3**(4): 491-502.
- Ong, K. T., M. T. Mashek, S. Y. Bu, A. S. Greenberg and D. G. Mashek** (2011). "Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning." *Hepatology* **53**(1): 116-126.
- Op De Beeck, A., R. Montserret, S. Duvet, L. Cocquerel, R. Cacan, B. Barberot, M. Le Maire, F. Penin and J. Dubuisson** (2000). "The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization." *J Biol Chem* **275**(40): 31428-31437.
- Orland, J. R., T. L. Wright and S. Cooper** (2001). "Acute hepatitis C." *Hepatology* **33**(2): 321-327.
- Ostermeyer, A. G., J. M. Paci, Y. Zeng, D. M. Lublin, S. Munro and D. A. Brown** (2001). "Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets." *J Cell Biol* **152**(5): 1071-1078.
- Owen, D. M., H. Huang, J. Ye and M. Gale, Jr.** (2009). "Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor." *Virology* **394**(1): 99-108.
- Ozeki, S., J. Cheng, K. Tauchi-Sato, N. Hatano, H. Taniguchi and T. Fujimoto** (2005). "Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane." *J Cell Sci* **118**(Pt 12): 2601-2611.
- Pan, M., V. Maitin, S. Parathath, U. Andreo, S. X. Lin, C. St Germain, Z. Yao, F. R. Maxfield, K. J. Williams and E. A. Fisher** (2008). "Presecretory oxidation, aggregation, and autophagic destruction of apoprotein-B: a pathway for late-stage quality control." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(15): 5862-5867.
- Pang, P. S., E. Jankowsky, P. J. Planet and A. M. Pyle** (2002). "The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding." *EMBO J* **21**(5): 1168-1176.
- Parvaiz, F., S. Manzoor, J. Iqbal, S. McRae, F. Javed, Q. L. Ahmed and G. Waris** (2014). "Hepatitis C virus nonstructural protein 5A favors upregulation of gluconeogenic and lipogenic gene expression leading towards insulin resistance: a metabolic syndrome." *Arch Virol* **159**(5): 1017-1025.
- Pascussi, J. M., L. Drocourt, S. Gerbal-Chaloin, J. M. Fabre, P. Maurel and M. J. Vilarem** (2001). "Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor." *Eur J Biochem* **268**(24): 6346-6358.
- Patel, A. H., J. Wood, F. Penin, J. Dubuisson and J. A. McKeating** (2000). "Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions

- critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding." *J Gen Virol* **81**(Pt 12): 2873-2883.
- Paul, D., S. Hoppe, G. Saher, J. Krijnse-Locker and R. Bartenschlager** (2013). "Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment." *J Virol* **87**(19): 10612-10627.
- Pawella, L. M., M. Hashani, E. Eiteneuer, M. Renner, R. Bartenschlager, P. Schirmacher and B. K. Straub** (2014). "Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis." *Journal of hepatology* **60**(3): 633-642.
- Pawlotsky, J. M.** (2004). "Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease." *Trends Microbiol* **12**(2): 96-102.
- Pawlotsky, J. M., J. J. Feld, S. Zeuzem and J. H. Hoofnagle** (2015). "From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure." *Journal of hepatology* **62**(1 Suppl): S87-99.
- Pawlotsky, J. M., G. Germanidis, P. O. Frainais, M. Bouvier, A. Soulier, M. Pellerin and D. Dhumeaux** (1999). "Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy." *J Virol* **73**(8): 6490-6499.
- Pearce, J.** (1983). "Fatty acid synthesis in liver and adipose tissue." *Proc Nutr Soc* **42**(2): 263-271.
- Pene, V., C. Hernandez, C. Vauloup-Fellous, J. Garaud-Aunis and A. R. Rosenberg** (2009). "Sequential processing of hepatitis C virus core protein by host cell signal peptidase and signal peptide peptidase: a reassessment." *J Viral Hepat* **16**(10): 705-715.
- Pene, V., Q. Li, C. Sodroski, C. S. Hsu and T. J. Liang** (2015). "Dynamic Interaction of Stress Granules, DDX3X, and IKK-alpha Mediates Multiple Functions in Hepatitis C Virus Infection." *J Virol* **89**(10): 5462-5477.
- Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H. E. Blum, R. Bartenschlager and D. Moradpour** (2004). "Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A." *J Biol Chem* **279**(39): 40835-40843.
- Penno, A., G. Hackenbroich and C. Thiele** (2013). "Phospholipids and lipid droplets." *Biochimica et biophysica acta* **1831**(3): 589-594.
- Perlemuter, G., A. Sabile, P. Letteron, G. Vona, A. Topilco, Y. Chretien, K. Koike, D. Pessayre, J. Chapman, G. Barba and C. Brechot** (2002). "Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**(2): 185-194.
- Perz, J. F., G. L. Armstrong, L. A. Farrington, Y. J. Hutin and B. P. Bell** (2006). "The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide." *Journal of hepatology* **45**(4): 529-538.
- Pestova, T. V., I. N. Shatsky, S. P. Fletcher, R. J. Jackson and C. U. Hellen** (1998). "A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs." *Genes Dev* **12**(1): 67-83.
- Petit, J. M., M. Benichou, L. Duvillard, V. Jooste, J. B. Bour, A. Minello, B. Verges, J. M. Brun, P. Gambert and P. Hillon** (2003). "Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis." *Am J Gastroenterol* **98**(5): 1150-1154.

- Petit, M. A., M. Lievre, S. Peyrol, S. De Sequeira, P. Berthillon, R. W. Ruigrok and C. Trepo** (2005). "Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients." *Virology* **336**(2): 144-153.
- Peyrou, M., S. Clement, C. Maier, L. Bourgoïn, E. Branche, S. Conzelmann, V. Kaddai, M. Foti and F. Negro** (2013). "PTEN protein phosphatase activity regulates hepatitis C virus secretion through modulation of cholesterol metabolism." *Journal of hepatology* **59**(3): 420-426.
- Phan, T., A. Kohlway, P. Dimberu, A. M. Pyle and B. D. Lindenbach** (2011). "The acidic domain of hepatitis C virus NS4A contributes to RNA replication and virus particle assembly." *J Virol* **85**(3): 1193-1204.
- Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F. L. Cosset and R. Bartenschlager** (2006). "Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(19): 7408-7413.
- Pietschmann, T., V. Lohmann, A. Kaul, N. Krieger, G. Rinck, G. Rutter, D. Strand and R. Bartenschlager** (2002). "Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture." *J Virol* **76**(8): 4008-4021.
- Pietschmann, T., V. Lohmann, G. Rutter, K. Kurpanek and R. Bartenschlager** (2001). "Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs." *J Virol* **75**(3): 1252-1264.
- Pietschmann, T., M. Zayas, P. Meuleman, G. Long, N. Appel, G. Koutsoudakis, S. Kallis, G. Leroux-Roels, V. Lohmann and R. Bartenschlager** (2009). "Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations." *PLoS pathogens* **5**(6): e1000475.
- Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A. J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi and S. Abrignani** (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." *Science* **282**(5390): 938-941.
- Ploegh, H. L.** (2007). "A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum." *Nature* **448**(7152): 435-438.
- Ploen, D., M. L. Hafirassou, K. Himmelsbach, D. Sauter, M. L. Biniossek, T. S. Weiss, T. F. Baumert, C. Schuster and E. Hildt** (2013a). "TIP47 plays a crucial role in the life cycle of hepatitis C virus." *Journal of hepatology* **58**(6): 1081-1088.
- Ploen, D., M. L. Hafirassou, K. Himmelsbach, S. A. Schille, M. L. Biniossek, T. F. Baumert, C. Schuster and E. Hildt** (2013b). "TIP47 is associated with the hepatitis C virus and its interaction with Rab9 is required for release of viral particles." *Eur J Cell Biol* **92**(12): 374-382.
- Ploss, A., M. J. Evans, V. A. Gaysinskaya, M. Panis, H. You, Y. P. de Jong and C. M. Rice** (2009). "Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells." *Nature* **457**(7231): 882-886.
- Ploss, A., S. R. Khetani, C. T. Jones, A. J. Syder, K. Trehan, V. A. Gaysinskaya, K. Mu, K. Ritola, C. M. Rice and S. N. Bhatia** (2010). "Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(7): 3141-3145.
- Podevin, P., A. Carpentier, V. Pene, L. Aoudjehane, M. Carriere, S. Zaidi, C. Hernandez, V. Calle, J. F. Meritet, O. Scatton, M. Dreux, F. L. Cosset, T. Wakita, R. Bartenschlager, S. Demignot, F. Conti, A. R. Rosenberg and Y. Calmus** (2010). "Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes." *Gastroenterology* **139**(4): 1355-1364.

- Pol, A., S. P. Gross and R. G. Parton** (2014). "Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites." *J Cell Biol* **204**(5): 635-646.
- Pollard, T. D., W. C. Earnshaw and K. Biomédical** (2004). "Biologie cellulaire ill. par Graham T. Johnson trad. de l'anglais par Kraus Biomédical coordination scientifique de l'éd. française, Pr Chantal Housset, Pr Nour-Eddine Lomri, Pr Joëlle Masliah avec la collab. de Dr Abderrahim Lomri, Dr Laura Fouassier préf. à l'éd. française Pr Claude Prigent." *Campus référence*. Paris, *Elsevier*: XVI-853.
- Pollock, S., N. B. Nichita, A. Bohmer, C. Radulescu, R. A. Dwek and N. Zitzmann** (2010). "Polyunsaturated liposomes are antiviral against hepatitis B and C viruses and HIV by decreasing cholesterol levels in infected cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(40): 17176-17181.
- Popescu, C. I., N. Callens, D. Trinel, P. Roingeard, D. Moradpour, V. Descamps, G. Duverlie, F. Penin, L. Heliot, Y. Rouille and J. Dubuisson** (2011). "NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly." *PLoS pathogens* **7**(2): e1001278.
- Popescu, C. I., L. Riva, O. Vlaicu, R. Farhat, Y. Rouille and J. Dubuisson** (2014). "Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism." *Biology (Basel)* **3**(4): 892-921.
- Postic, C. and J. Girard** (2008). "Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice." *J Clin Invest* **118**(3): 829-838.
- Poynard, T., V. Ratziu, J. McHutchison, M. Manns, Z. Goodman, S. Zeuzem, Z. Younossi and J. Albrecht** (2003). "Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C." *Hepatology* **38**(1): 75-85.
- Prentoe, J., T. B. Jensen, P. Meuleman, S. B. Serre, T. K. Scheel, G. Leroux-Roels, J. M. Gottwein and J. Bukh** (2011). "Hypervariable region 1 differentially impacts viability of hepatitis C virus strains of genotypes 1 to 6 and impairs virus neutralization." *J Virol* **85**(5): 2224-2234.
- Prince, A. M., T. Huima-Byron, T. S. Parker and D. M. Levine** (1996). "Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins." *J Viral Hepat* **3**(1): 11-17.
- Qiang, G., L. Yang, R. P. Witek and R. Jhaveri** (2009). "Recombinant adenoviruses expressing steatosis-associated hepatitis C virus genotype 3 core protein produce intracellular lipid accumulation in cultured and primary hepatocytes." *Virus Res* **139**(1): 127-130.
- Raabe, M., M. M. Veniant, M. A. Sullivan, C. H. Zlot, J. Bjorkegren, L. B. Nielsen, J. S. Wong, R. L. Hamilton and S. G. Young** (1999). "Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice." *J Clin Invest* **103**(9): 1287-1298.
- Rahim, A., E. Nafi-valencia, S. Siddiqi, R. Basha, C. C. Runyon and S. A. Siddiqi** (2012). "Proteomic analysis of the very low density lipoprotein (VLDL) transport vesicles." *J Proteomics* **75**(7): 2225-2235.
- Randall, G., M. Panis, J. D. Cooper, T. L. Tellinghuisen, K. E. Sukhodolets, S. Pfeffer, M. Landthaler, P. Landgraf, S. Kan, B. D. Lindenbach, M. Chien, D. B. Weir, J. J. Russo, J. Ju, M. J. Brownstein, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl and C. M. Rice** (2007). "Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(31): 12884-12889.
- Rasmussen, A. L., D. L. Diamond, J. E. McDermott, X. Gao, T. O. Metz, M. M. Matzke, V. S. Carter, S. E. Belisle, M. J. Korth, K. M. Waters, R. D. Smith and M. G. Katze**

- (2011). "Systems virology identifies a mitochondrial fatty acid oxidation enzyme, dodecenoyl coenzyme A delta isomerase, required for hepatitis C virus replication and likely pathogenesis." *J Virol* **85**(22): 11646-11654.
- Raymond, V. A., S. Selliah, C. Ethier, R. Houle, L. Jouan, T. Maniere, D. Lamarre, B. Willems and M. Bilodeau** (2009). "Primary cultures of human hepatocytes isolated from hepatitis C virus-infected cirrhotic livers as a model to study hepatitis C infection." *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **29**(6): 942-949.
- Review, T., D. R. LaBrecque, Z. Abbas, F. Anania, P. Ferenci, A. G. Khan, K. L. Goh, S. S. Hamid, V. Isakov, M. Lizarzabal, M. M. Penaranda, J. F. Ramos, S. Sarin, D. Stimac, A. B. Thomson, M. Umar, J. Krabshuis, A. LeMair and O. World Gastroenterology** (2014). "World Gastroenterology Organisation global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis." *J Clin Gastroenterol* **48**(6): 467-473.
- Reynolds, G. M., H. J. Harris, A. Jennings, K. Hu, J. Grove, P. F. Lalor, D. H. Adams, P. Balfe, S. G. Hubscher and J. A. McKeating** (2008). "Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue." *Hepatology* **47**(2): 418-427.
- Ribeiro, R. M., H. Li, S. Wang, M. B. Stoddard, G. H. Learn, B. T. Korber, T. Bhattacharya, J. Guedj, E. H. Parrish, B. H. Hahn, G. M. Shaw and A. S. Perelson** (2012). "Quantifying the diversification of hepatitis C virus (HCV) during primary infection: estimates of the in vivo mutation rate." *PLoS pathogens* **8**(8): e1002881.
- Roccasecca, R., H. Ansuini, A. Vitelli, A. Meola, E. Scarselli, S. Acali, M. Pezzanera, B. B. Ercole, J. McKeating, A. Yagnik, A. Lahm, A. Tramontano, R. Cortese and A. Nicosia** (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." *J Virol* **77**(3): 1856-1867.
- Roingeard, P., C. Hourieux, E. Blanchard, D. Brand and M. Ait-Goughoulte** (2004). "Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis." *Biol Cell* **96**(2): 103-108.
- Roingeard, P., C. Hourieux, E. Blanchard and G. Prensier** (2008). "Hepatitis C virus budding at lipid droplet-associated ER membrane visualized by 3D electron microscopy." *Histochem Cell Biol* **130**(3): 561-566.
- Romero-Brey, I. and R. Bartenschlager** (2014). "Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses." *Viruses* **6**(7): 2826-2857.
- Romero-Brey, I., A. Merz, A. Chiramel, J. Y. Lee, P. Chlanda, U. Haselman, R. Santarella-Mellwig, A. Habermann, S. Hoppe, S. Kallis, P. Walther, C. Antony, J. Krijnse-Locker and R. Bartenschlager** (2012). "Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication." *PLoS pathogens* **8**(12): e1003056.
- Roohvand, F., P. Maillard, J. P. Lavergne, S. Boulant, M. Walic, U. Andreo, L. Goueslain, F. Helle, A. Mallet, J. McLauchlan and A. Budkowska** (2009). "Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein." *J Biol Chem* **284**(20): 13778-13791.
- Roth, J.** (2002). "Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions." *Chem Rev* **102**(2): 285-303.
- Roussel, J., A. Pillez, C. Montpellier, G. Duverlie, A. Cahour, J. Dubuisson and C. Wychowski** (2003). "Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein." *J Gen Virol* **84**(Pt 7): 1751-1759.

- Rubbia-Brandt, L., R. Quadri, K. Abid, E. Giostra, P. J. Male, G. Mentha, L. Spahr, J. P. Zarski, B. Borisch, A. Hadengue and F. Negro** (2000). "Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3." *Journal of hepatology* **33**(1): 106-115.
- Rumin, S., P. Berthillon, E. Tanaka, K. Kiyosawa, M. A. Trabaud, T. Bizollon, C. Gouillat, P. Gripon, C. Guguen-Guillouzo, G. Inchauspe and C. Trepo** (1999). "Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro." *J Gen Virol* **80** (Pt 11): 3007-3018.
- Rustaeus, S., P. Stillemark, K. Lindberg, D. Gordon and S. O. Olofsson** (1998). "The microsomal triglyceride transfer protein catalyzes the post-translational assembly of apolipoprotein B-100 very low density lipoprotein in McA-RH7777 cells." *J Biol Chem* **273**(9): 5196-5203.
- Saeed, M., U. Andreo, H. Y. Chung, C. Espiritu, A. D. Branch, J. M. Silva and C. M. Rice** (2015). "SEC14L2 enables pan-genotype HCV replication in cell culture." *Nature* **524**(7566): 471-475.
- Sahini, N. and J. Borlak** (2014). "Recent insights into the molecular pathophysiology of lipid droplet formation in hepatocytes." *Prog Lipid Res* **54**: 86-112.
- Sainz, B., Jr., N. Barretto, D. N. Martin, N. Hiraga, M. Imamura, S. Hussain, K. A. Marsh, X. Yu, K. Chayama, W. A. Alrefai and S. L. Uprichard** (2012). "Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor." *Nat Med* **18**(2): 281-285.
- Salloum, S., H. Wang, C. Ferguson, R. G. Parton and A. W. Tai** (2013). "Rab18 binds to hepatitis C virus NS5A and promotes interaction between sites of viral replication and lipid droplets." *PLoS pathogens* **9**(8): e1003513.
- Santolini, E., L. Pacini, C. Fipaldini, G. Migliaccio and N. Monica** (1995). "The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide." *J Virol* **69**(12): 7461-7471.
- Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R. M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese and A. Vitelli** (2002). "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus." *EMBO J* **21**(19): 5017-5025.
- Scheel, T. K., J. M. Gottwein, T. B. Jensen, J. C. Prentoe, A. M. Hoegh, H. J. Alter, J. Eugen-Olsen and J. Bukh** (2008). "Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(3): 997-1002.
- Schmidt-Mende, J., E. Bieck, T. Hugle, F. Penin, C. M. Rice, H. E. Blum and D. Moradpour** (2001). "Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase." *J Biol Chem* **276**(47): 44052-44063.
- Schmitt, M., N. Scrima, D. Radujkovic, C. Caillet-Saguy, P. C. Simister, P. Friebe, O. Wicht, R. Klein, R. Bartenschlager, V. Lohmann and S. Bressanelli** (2011). "A comprehensive structure-function comparison of hepatitis C virus strain JFH1 and J6 polymerases reveals a key residue stimulating replication in cell culture across genotypes." *J Virol* **85**(6): 2565-2581.
- Scholtes, C., O. Diaz, V. Icard, A. Kaul, R. Bartenschlager, V. Lotteau and P. Andre** (2008). "Enhancement of genotype 1 hepatitis C virus replication by bile acids through FXR." *Journal of hepatology* **48**(2): 192-199.
- Schregel, V., S. Jacobi, F. Penin and N. Tautz** (2009). "Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(13): 5342-5347.

- Schroeder, B., R. J. Schulze, S. G. Weller, A. C. Sletten, C. A. Casey and M. A. McNiven** (2015). "The small GTPase Rab7 as a central regulator of hepatocellular lipophagy." *Hepatology* **61**(6): 1896-1907.
- Schwer, B., S. Ren, T. Pietschmann, J. Kartenbeck, K. Kaehlcke, R. Bartenschlager, T. S. Yen and M. Ott** (2004). "Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif." *J Virol* **78**(15): 7958-7968.
- Serebrov, V. and A. M. Pyle** (2004). "Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase." *Nature* **430**(6998): 476-480.
- Serfaty, L., T. Andreani, P. Giral, N. Carbonell, O. Chazouilleres and R. Poupon** (2001). "Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C." *Journal of hepatology* **34**(3): 428-434.
- Sharma, N. R., G. Mateu, M. Dreux, A. Grakoui, F. L. Cosset and G. B. Melikyan** (2011). "Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion." *J Biol Chem* **286**(35): 30361-30376.
- Sharma, P., V. Balan, J. Hernandez, M. Rosati, J. Williams, H. Rodriguez-Luna, J. Schwartz, E. Harrison, M. Anderson, T. Byrne, H. E. Vargas, D. D. Douglas and J. Rakela** (2004). "Hepatic steatosis in hepatitis C virus genotype 3 infection: does it correlate with body mass index, fibrosis, and HCV risk factors?" *Dig Dis Sci* **49**(1): 25-29.
- Shavinskaya, A., S. Boulant, F. Penin, J. McLauchlan and R. Bartenschlager** (2007). "The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly." *J Biol Chem* **282**(51): 37158-37169.
- Shehat, M. G., M. Bahey-El-Din, M. A. Kassem, F. A. Farghaly, M. H. Abdul-Rahman and N. H. Fanaki** (2015). "Recombinant expression of the alternate reading frame protein (ARFP) of hepatitis C virus genotype 4a (HCV-4a) and detection of ARFP and anti-ARFP antibodies in HCV-infected patients." *Arch Virol* **160**(8): 1939-1952.
- Shi, S. T., K. J. Lee, H. Aizaki, S. B. Hwang and M. M. Lai** (2003). "Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2." *J Virol* **77**(7): 4160-4168.
- Shikano, S. and M. Li** (2003). "Membrane receptor trafficking: evidence of proximal and distal zones conferred by two independent endoplasmic reticulum localization signals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 5783-5788.
- Shimizu, Y., T. Hishiki, K. Sugiyama, K. Ogawa, K. Funami, A. Kato, Y. Ohsaki, T. Fujimoto, H. Takaku and K. Shimotohno** (2010). "Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins." *Virology* **407**(1): 152-159.
- Shimoike, T., S. Mimori, H. Tani, Y. Matsuura and T. Miyamura** (1999). "Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation." *J Virol* **73**(12): 9718-9725.
- Shindou, H., D. Hishikawa, T. Harayama, M. Eto and T. Shimizu** (2013). "Generation of membrane diversity by lysophospholipid acyltransferases." *J Biochem* **154**(1): 21-28.
- Shindou, H., D. Hishikawa, T. Harayama, K. Yuki and T. Shimizu** (2009). "Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research." *J Lipid Res* **50** Suppl: S46-51.
- Shindou, H. and T. Shimizu** (2009). "Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases." *J Biol Chem* **284**(1): 1-5.
- Shlomai, A., M. M. Rechtman, E. O. Burdelova, A. Zilberberg, S. Hoffman, I. Solar, S. Fishman, Z. Halpern and E. H. Sklan** (2012). "The metabolic regulator PGC-1alpha

- links hepatitis C virus infection to hepatic insulin resistance." *Journal of hepatology* **57**(4): 867-873.
- Silbernagl, S. and A. Despopoulos** (2009). "Color atlas of physiology." Stuttgart; New York, *Thieme*. 6th Ed.
- Silver, D. L., N. Wang, X. Xiao and A. R. Tall** (2001). "High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion." *J Biol Chem* **276**(27): 25287-25293.
- Simister, P., M. Schmitt, M. Geitmann, O. Wicht, U. H. Danielson, R. Klein, S. Bressanelli and V. Lohmann** (2009). "Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase." *J Virol* **83**(22): 11926-11939.
- Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D. G. Murphy, H. Okamoto, J. M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I. T. Shin, L. J. Stuyver, H. J. Thiel, S. Viazov, A. J. Weiner and A. Widell** (2005). "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes." *Hepatology* **42**(4): 962-973.
- Simmonds, P., E. C. Holmes, T. A. Cha, S. W. Chan, F. McOmish, B. Irvine, E. Beall, P. L. Yap, J. Kolberg and M. S. Urdea** (1993). "Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region." *J Gen Virol* **74** (Pt 11): 2391-2399.
- Singaravelu, R., R. Chen, R. K. Lyn, D. M. Jones, S. O'Hara, Y. Rouleau, J. Cheng, P. Srinivasan, N. Nasheri, R. S. Russell, D. L. Tyrrell and J. P. Pezacki** (2014a). "Hepatitis C virus induced up-regulation of microRNA-27: a novel mechanism for hepatic steatosis." *Hepatology* **59**(1): 98-108.
- Singaravelu, R., J. Delcorde, R. K. Lyn, R. H. Steenbergen, D. M. Jones, D. L. Tyrrell, R. S. Russell and J. P. Pezacki** (2014b). "Investigating the antiviral role of cell death-inducing DFF45-like effector B in HCV replication." *FEBS J* **281**(16): 3751-3765.
- Singaravelu, R., R. K. Lyn, P. Srinivasan, J. Delcorde, R. H. Steenbergen, D. L. Tyrrell and J. P. Pezacki** (2013). "Human serum activates CIDEB-mediated lipid droplet enlargement in hepatoma cells." *Biochemical and biophysical research communications* **441**(2): 447-452.
- Singh, R., S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A. M. Cuervo and M. J. Czaja** (2009). "Autophagy regulates lipid metabolism." *Nature* **458**(7242): 1131-1135.
- Skinner, J. R., T. M. Shew, D. M. Schwartz, A. Tzekov, C. M. Lepus, N. A. Abumrad and N. E. Wolins** (2009). "Diacylglycerol enrichment of endoplasmic reticulum or lipid droplets recruits perilipin 3/TIP47 during lipid storage and mobilization." *J Biol Chem* **284**(45): 30941-30948.
- Smith, D. B., J. Bukh, C. Kuiken, A. S. Muerhoff, C. M. Rice, J. T. Stapleton and P. Simmonds** (2014). "Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource." *Hepatology* **59**(1): 318-327.
- Smith, S. J., S. Cases, D. R. Jensen, H. C. Chen, E. Sande, B. Tow, D. A. Sanan, J. Raber, R. H. Eckel and R. V. Farese, Jr.** (2000). "Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat." *Nat Genet* **25**(1): 87-90.
- Sourisseau, M., M. L. Michta, C. Zony, B. Israelow, S. E. Hopcraft, C. M. Narbus, A. Parra Martin and M. J. Evans** (2013). "Temporal analysis of hepatitis C virus cell entry with occludin directed blocking antibodies." *PLoS pathogens* **9**(3): e1003244.

- Spahn, C. M., J. S. Kieft, R. A. Grassucci, P. A. Penczek, K. Zhou, J. A. Doudna and J. Frank** (2001). "Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit." *Science* **291**(5510): 1959-1962.
- Stapleford, K. A. and B. D. Lindenbach** (2011). "Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes." *J Virol* **85**(4): 1706-1717.
- Stapleton, J. T., S. Fong, A. S. Muerhoff, J. Bukh and P. Simmonds** (2011). "The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae." *J Gen Virol* **92**(Pt 2): 233-246.
- Steenbergen, R. H., M. A. Joyce, B. S. Thomas, D. Jones, J. Law, R. Russell, M. Houghton and D. L. Tyrrell** (2013). "Human serum leads to differentiation of human hepatoma cells, restoration of very-low-density lipoprotein secretion, and a 1000-fold increase in HCV Japanese fulminant hepatitis type 1 titers." *Hepatology* **58**(6): 1907-1917.
- Steinmann, E., C. Brohm, S. Kallis, R. Bartenschlager and T. Pietschmann** (2008). "Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles." *J Virol* **82**(14): 7034-7046.
- Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A. H. Patel, R. Bartenschlager and T. Pietschmann** (2007). "Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions." *PLoS pathogens* **3**(7): e103.
- Steinmann, E. and T. Pietschmann** (2010). "Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy." *Viruses* **2**(9): 2078-2095.
- Stone, S. J., M. C. Levin, P. Zhou, J. Han, T. C. Walther and R. V. Farese, Jr.** (2009). "The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria." *J Biol Chem* **284**(8): 5352-5361.
- Stone, S. J., H. M. Myers, S. M. Watkins, B. E. Brown, K. R. Feingold, P. M. Elias and R. V. Farese, Jr.** (2004). "Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice." *J Biol Chem* **279**(12): 11767-11776.
- Straub, B. K., B. Gyoengyoesi, M. Koenig, M. Hashani, L. M. Pawella, E. Herpel, W. Mueller, S. Macher-Goeppinger, H. Heid and P. Schirmacher** (2013). "Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation." *Histopathology* **62**(4): 617-631.
- Strick-Marchand, H., M. Dusseaux, S. Darche, N. D. Huntington, N. Legrand, G. Masse-Ranson, E. Corcuff, J. Ahodantin, K. Weijer, H. Spits, D. Kremsdorf and J. P. Di Santo** (2015). "A novel mouse model for stable engraftment of a human immune system and human hepatocytes." *PloS one* **10**(3): e0119820.
- Stumpf, M. P. and O. G. Pybus** (2002). "Genetic diversity and models of viral evolution for the hepatitis C virus." *FEMS Microbiol Lett* **214**(2): 143-152.
- Su, A. I., J. P. Pezacki, L. Wodicka, A. D. Brideau, L. Supekova, R. Thimme, S. Wieland, J. Bukh, R. H. Purcell, P. G. Schultz and F. V. Chisari** (2002). "Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15669-15674.
- Sun, Z., J. Gong, H. Wu, W. Xu, L. Wu, D. Xu, J. Gao, J. W. Wu, H. Yang, M. Yang and P. Li** (2013). "Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes." *Nat Commun* **4**: 1594.
- Suzich, J. A., J. K. Tamura, F. Palmer-Hill, P. Warrenner, A. Grakoui, C. M. Rice, S. M. Feinstone and M. S. Collett** (1993). "Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-

- stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes." *J Virol* **67**(10): 6152-6158.
- Suzuki, M., Y. Iio, N. Saito and T. Fujimoto** (2013). "Protein kinase Ceta is targeted to lipid droplets." *Histochem Cell Biol* **139**(4): 505-511.
- Suzuki, M., T. Murakami, J. Cheng, H. Kano, M. Fukata and T. Fujimoto** (2015). "ELMOD2 is anchored to lipid droplets by palmitoylation and regulates adipocyte triglyceride lipase recruitment." *Mol Biol Cell* **26**(12): 2333-2342.
- Suzuki, M., Y. Shinohara, Y. Ohsaki and T. Fujimoto** (2011). "Lipid droplets: size matters." *J Electron Microsc (Tokyo)* **60 Suppl 1**: S101-116.
- Syed, G. H., Y. Amako and A. Siddiqui** (2010). "Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism." *Trends Endocrinol Metab* **21**(1): 33-40.
- Sztalryd, C., G. Xu, H. Dorward, J. T. Tansey, J. A. Contreras, A. R. Kimmel and C. Londos** (2003). "Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation." *J Cell Biol* **161**(6): 1093-1103.
- Tai, C. L., W. K. Chi, D. S. Chen and L. H. Hwang** (1996). "The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3)." *J Virol* **70**(12): 8477-8484.
- Tanaka, N., K. Moriya, K. Kiyosawa, K. Koike, F. J. Gonzalez and T. Aoyama** (2008). "PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice." *J Clin Invest* **118**(2): 683-694.
- Targett-Adams, P., G. Hope, S. Boulant and J. McLauchlan** (2008). "Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production." *J Biol Chem* **283**(24): 16850-16859.
- Tellinghuisen, T. L., K. L. Foss and J. Treadaway** (2008a). "Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein." *PLoS pathogens* **4**(3): e1000032.
- Tellinghuisen, T. L., K. L. Foss, J. C. Treadaway and C. M. Rice** (2008b). "Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein." *J Virol* **82**(3): 1073-1083.
- Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano, A. E. Gorbalenya and C. M. Rice** (2004). "The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein." *J Biol Chem* **279**(47): 48576-48587.
- Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano and C. M. Rice** (2005). "Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase." *Nature* **435**(7040): 374-379.
- Terai, S., T. Noma, T. Kimura, A. Nakazawa, F. Kurokawa and K. Okita** (1997). "Wild-type p53 gene-induced morphological changes and growth suppression in hepatoma cells." *J Gastroenterol* **32**(3): 330-337.
- Thiam, A. R., R. V. Farese, Jr. and T. C. Walther** (2013). "The biophysics and cell biology of lipid droplets." *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**(12): 775-786.
- Thomopoulos, K. C., V. Arvaniti, A. C. Tsamantas, D. Dimitropoulou, C. A. Gogos, D. Siagris, G. J. Theocharis and C. Labropoulou-Karatza** (2006). "Prevalence of liver steatosis in patients with chronic hepatitis B: a study of associated factors and of relationship with fibrosis." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **18**(3): 233-237.
- Thompson, A. A., A. Zou, J. Yan, R. Duggal, W. Hao, D. Molina, C. N. Cronin and P. A. Wells** (2009). "Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity." *Biochemistry* **48**(5): 906-916.

- Thomssen, R., S. Bonk, C. Propfe, K. H. Heermann, H. G. Kochel and A. Uy** (1992). "Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein." *Med Microbiol Immunol* **181**(5): 293-300.
- Thomssen, R., S. Bonk and A. Thiele** (1993). "Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins." *Med Microbiol Immunol* **182**(6): 329-334.
- Timpe, J. M., Z. Stamataki, A. Jennings, K. Hu, M. J. Farquhar, H. J. Harris, A. Schwarz, I. Desombere, G. L. Roels, P. Balfe and J. A. McKeating** (2008). "Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies." *Hepatology* **47**(1): 17-24.
- Tiwari, S. and S. A. Siddiqi** (2012). "Intracellular trafficking and secretion of VLDL." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**(5): 1079-1086.
- Tsai, W. C., S. D. Hsu, C. S. Hsu, T. C. Lai, S. J. Chen, R. Shen, Y. Huang, H. C. Chen, C. H. Lee, T. F. Tsai, M. T. Hsu, J. C. Wu, H. D. Huang, M. S. Shiao, M. Hsiao and A. P. Tsou** (2012). "MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis." *J Clin Invest* **122**(8): 2884-2897.
- Uehara, T., H. Kikuchi, S. Miyazaki, I. Iino, T. Setoguchi, Y. Hiramatsu, M. Ohta, K. Kamiya, Y. Morita, H. Tanaka, S. Baba, T. Hayasaka, M. Setou and H. Konno** (2015). "Overexpression of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 1 and Concomitant Lipid Alterations in Gastric Cancer." *Ann Surg Oncol*.
- van der Bliek, A. M.** (2005). "A sixth sense for Rab5." *Nat Cell Biol* **7**(6): 548-550.
- van Sriel, A. B. and C. G. Figdor** (2010). "The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases." *Microbes Infect* **12**(2): 106-112.
- Vassilaki, N., P. Friebe, P. Meuleman, S. Kallis, A. Kaul, G. Paranhos-Baccala, G. Leroux-Roels, P. Mavromara and R. Bartenschlager** (2008). "Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication." *J Virol* **82**(23): 11503-11515.
- Vauloup-Fellous, C., V. Pene, J. Garaud-Aunis, F. Harper, S. Bardin, Y. Suire, E. Pichard, A. Schmitt, P. Sogni, G. Pierron, P. Briand and A. R. Rosenberg** (2006). "Signal peptide peptidase-catalyzed cleavage of hepatitis C virus core protein is dispensable for virus budding but destabilizes the viral capsid." *J Biol Chem* **281**(38): 27679-27692.
- Vausselin, T., N. Calland, S. Belouzard, V. Descamps, F. Douam, F. Helle, C. Francois, D. Lavillette, G. Duverlie, A. Wahid, L. Feneant, L. Cocquerel, Y. Guerardel, C. Wychowski, C. Biot and J. Dubuisson** (2013). "The antimalarial ferroquine is an inhibitor of hepatitis C virus." *Hepatology* **58**(1): 86-97.
- Verdegem, D., A. Badillo, J. M. Wieruszkeski, I. Landrieu, A. Leroy, R. Bartenschlager, F. Penin, G. Lippens and X. Hanouille** (2011). "Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A." *J Biol Chem* **286**(23): 20441-20454.
- Vieyres, G., C. Brohm, M. Friesland, J. Gentsch, B. Wolk, P. Roingeard, E. Steinmann and T. Pietschmann** (2013). "Subcellular localization and function of an epitope-tagged p7 viroporin in hepatitis C virus-producing cells." *J Virol* **87**(3): 1664-1678.
- Vieyres, G., X. Thomas, V. Descamps, G. Duverlie, A. H. Patel and J. Dubuisson** (2010). "Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus." *J Virol* **84**(19): 10159-10168.
- Vinciguerra, M., C. Veyrat-Durebex, M. A. Moukil, L. Rubbia-Brandt, F. Rohner-Jeanrenaud and M. Foti** (2008). "PTEN down-regulation by unsaturated fatty acids

- triggers hepatic steatosis via an NF-kappaBp65/mTOR-dependent mechanism." *Gastroenterology* **134**(1): 268-280.
- Wahid, A., F. Helle, V. Descamps, G. Duverlie, F. Penin and J. Dubuisson** (2013). "Disulfide bonds in hepatitis C virus glycoprotein E1 control the assembly and entry functions of E2 glycoprotein." *J Virol* **87**(3): 1605-1617.
- Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager and T. J. Liang** (2005). "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." *Nat Med* **11**(7): 791-796.
- Walker, C. M.** (1997). "Comparative features of hepatitis C virus infection in humans and chimpanzees." *Springer Semin Immunopathol* **19**(1): 85-98.
- Walther, T. C. and R. V. Farese, Jr.** (2009). "The life of lipid droplets." *Biochimica et biophysica acta* **1791**(6): 459-466.
- Wang, C., P. Sarnow and A. Siddiqui** (1993). "Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism." *J Virol* **67**(6): 3338-3344.
- Wang, H., D. Gilham and R. Lehner** (2007). "Proteomic and lipid characterization of apolipoprotein B-free luminal lipid droplets from mouse liver microsomes: implications for very low density lipoprotein assembly." *J Biol Chem* **282**(45): 33218-33226.
- Wang, H., J. W. Perry, A. S. Lauring, P. Neddermann, R. De Francesco and A. W. Tai** (2014). "Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking." *Gastroenterology* **146**(5): 1373-1385 e1371-1311.
- Wang, H., A. D. Quiroga and R. Lehner** (2013). "Analysis of lipid droplets in hepatocytes." *Methods Cell Biol* **116**: 107-127.
- Wang, H., U. Sreenivasan, H. Hu, A. Saladino, B. M. Polster, L. M. Lund, D. W. Gong, W. C. Stanley and C. Sztalryd** (2011). "Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria." *J Lipid Res* **52**(12): 2159-2168.
- Waris, G., D. J. Felmlee, F. Negro and A. Siddiqui** (2007). "Hepatitis C virus induces proteolytic cleavage of sterol regulatory element binding proteins and stimulates their phosphorylation via oxidative stress." *J Virol* **81**(15): 8122-8130.
- Watashi, K., N. Ishii, M. Hijikata, D. Inoue, T. Murata, Y. Miyanari and K. Shimotohno** (2005). "Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase." *Mol Cell* **19**(1): 111-122.
- Weickert, M. O. and A. F. Pfeiffer** (2006). "Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism." *Diabetologia* **49**(8): 1732-1741.
- Welte, M. A.** (2007). "Proteins under new management: lipid droplets deliver." *Trends Cell Biol* **17**(8): 363-369.
- Westbrook, R. H. and G. Dusheiko** (2014). "Natural history of hepatitis C." *Journal of hepatology* **61**(1 Suppl): S58-68.
- Wilfling, F., A. R. Thiam, M. J. Olarte, J. Wang, R. Beck, T. J. Gould, E. S. Allgeyer, F. Pincet, J. Bewersdorf, R. V. Farese, Jr. and T. C. Walther** (2014). "Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting." *eLife* **3**: e01607.
- Wilfling, F., H. Wang, J. T. Haas, N. Krahmer, T. J. Gould, A. Uchida, J. X. Cheng, M. Graham, R. Christiano, F. Frohlich, X. Liu, K. K. Buhman, R. A. Coleman, J. Bewersdorf, R. V. Farese, Jr. and T. C. Walther** (2013). "Triacylglycerol synthesis

- enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets." *Dev Cell* **24**(4): 384-399.
- Witteveldt, J., M. J. Evans, J. Bitzegeio, G. Koutsoudakis, A. M. Owsianka, A. G. Angus, Z. Y. Keck, S. K. Fong, T. Pietschmann, C. M. Rice and A. H. Patel** (2009). "CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells." *J Gen Virol* **90**(Pt 1): 48-58.
- Wolins, N. E., D. L. Brasaemle and P. E. Bickel** (2006). "A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins." *FEBS Lett* **580**(23): 5484-5491.
- Wolk, B., D. Sansonno, H. G. Krausslich, F. Dammacco, C. M. Rice, H. E. Blum and D. Moradpour** (2000). "Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines." *J Virol* **74**(5): 2293-2304.
- Wozniak, A. L., S. Griffin, D. Rowlands, M. Harris, M. Yi, S. M. Lemon and S. A. Weinman** (2010). "Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production." *PLoS pathogens* **6**(9): e1001087.
- Wunschmann, S., J. D. Medh, D. Klinzmann, W. N. Schmidt and J. T. Stapleton** (2000). "Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor." *J Virol* **74**(21): 10055-10062.
- Wurie, H. R., L. Buckett and V. A. Zammit** (2011). "Evidence that diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) has dual membrane topology in the endoplasmic reticulum of HepG2 cells." *J Biol Chem* **286**(42): 36238-36247.
- Xiao, F., I. Fofana, L. Heydmann, H. Barth, E. Soulier, F. Habersetzer, M. Doffoel, J. Bukh, A. H. Patel, M. B. Zeisel and T. F. Baumert** (2014). "Hepatitis C virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents." *PLoS pathogens* **10**(5): e1004128.
- Xiao, F., I. Fofana, C. Thumann, L. Mailly, R. Alles, E. Robinet, N. Meyer, M. Schaeffer, F. Habersetzer, M. Doffoel, P. Leyssen, J. Neyts, M. B. Zeisel and T. F. Baumert** (2015). "Synergy of entry inhibitors with direct-acting antivirals uncovers novel combinations for prevention and treatment of hepatitis C." *Gut* **64**(3): 483-494.
- Xu, L., L. Zhou and P. Li** (2012). "CIDE proteins and lipid metabolism." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**(5): 1094-1098.
- Xu, S., R. Pei, M. Guo, Q. Han, J. Lai, Y. Wang, C. Wu, Y. Zhou, M. Lu and X. Chen** (2012). "Cytosolic phospholipase A2 gamma is involved in hepatitis C virus replication and assembly." *J Virol* **86**(23): 13025-13037.
- Xu, Z., J. Choi, T. S. Yen, W. Lu, A. Strohecker, S. Govindarajan, D. Chien, M. J. Selby and J. Ou** (2001). "Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift." *EMBO J* **20**(14): 3840-3848.
- Yamane, D., D. R. McGivern, E. Wauthier, M. Yi, V. J. Madden, C. Welsch, I. Antes, Y. Wen, P. E. Chugh, C. E. McGee, D. G. Widman, I. Misumi, S. Bandyopadhyay, S. Kim, T. Shimakami, T. Oikawa, J. K. Whitmire, M. T. Heise, D. P. Dittmer, C. C. Kao, S. M. Pitson, A. H. Merrill, Jr., L. M. Reid and S. M. Lemon** (2014). "Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation." *Nat Med* **20**(8): 927-935.
- Yamashita, A., H. Nakanishi, H. Suzuki, R. Kamata, K. Tanaka, K. Waku and T. Sugiura** (2007). "Topology of acyltransferase motifs and substrate specificity and accessibility in 1-acyl-sn-glycero-3-phosphate acyltransferase 1." *Biochimica et biophysica acta* **1771**(9): 1202-1215.

- Yamazaki, T., E. Sasaki, C. Kakinuma, T. Yano, S. Miura and O. Ezaki** (2005). "Increased very low density lipoprotein secretion and gonadal fat mass in mice overexpressing liver DGAT1." *J Biol Chem* **280**(22): 21506-21514.
- Yan, B. S., M. H. Tam and W. J. Syu** (1998). "Self-association of the C-terminal domain of the hepatitis-C virus core protein." *Eur J Biochem* **258**(1): 100-106.
- Yan, D. and V. M. Olkkonen** (2008). "Characteristics of oxysterol binding proteins." *Int Rev Cytol* **265**: 253-285.
- Yang, W., C. Qiu, N. Biswas, J. Jin, S. C. Watkins, R. C. Montelaro, C. B. Coyne and T. Wang** (2008). "Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus." *J Biol Chem* **283**(13): 8643-8653.
- Yao, Z., H. Zhou, D. Figeys, Y. Wang and M. Sundaram** (2013). "Microsome-associated luminal lipid droplets in the regulation of lipoprotein secretion." *Current opinion in lipidology* **24**(2): 160-170.
- Ye, J., J. Z. Li, Y. Liu, X. Li, T. Yang, X. Ma, Q. Li, Z. Yao and P. Li** (2009). "Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B." *Cell Metab* **9**(2): 177-190.
- Yi, M. and S. M. Lemon** (2009). "Genotype 1a HCV (H77S) infection system." *Methods Mol Biol* **510**: 337-346.
- Yi, M., Y. Ma, J. Yates and S. M. Lemon** (2009). "Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation." *PLoS pathogens* **5**(5): e1000403.
- Yi, M., R. A. Villanueva, D. L. Thomas, T. Wakita and S. M. Lemon** (2006). "Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2310-2315.
- Yonezawa, T., R. Kurata, M. Kimura and H. Inoko** (2011). "Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism." *Mol Biosyst* **7**(1): 91-100.
- Yu, G. Y., K. J. Lee, L. Gao and M. M. Lai** (2006). "Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein." *J Virol* **80**(12): 6013-6023.
- Yukse, K., W. L. Chen, D. Chien and J. H. Ou** (2009). "Ubiquitin-independent degradation of hepatitis C virus F protein." *J Virol* **83**(2): 612-621.
- Zannis, V. I., P. Fotakis, G. Koukos, D. Kardassis, C. Ehnholm, M. Jauhainen and A. Chroni** (2015). "HDL biogenesis, remodeling, and catabolism." *Handb Exp Pharmacol* **224**: 53-111.
- Zeisel, M. B., G. Koutsoudakis, E. K. Schnober, A. Haberstroh, H. E. Blum, F. L. Cosset, T. Wakita, D. Jaeck, M. Doffoel, C. Royer, E. Soulier, E. Schvoerer, C. Schuster, F. Stoll-Keller, R. Bartenschlager, T. Pietschmann, H. Barth and T. F. Baumert** (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**(6): 1722-1731.
- Zhang, J., G. Randall, A. Higginbottom, P. Monk, C. M. Rice and J. A. McKeating** (2004). "CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection." *J Virol* **78**(3): 1448-1455.
- Zhang, L., Z. Hong, W. Lin, R. X. Shao, K. Goto, V. W. Hsu and R. T. Chung** (2012). "ARF1 and GBF1 generate a PI4P-enriched environment supportive of hepatitis C virus replication." *PloS one* **7**(2): e32135.
- Zhao, Y., Y. Q. Chen, T. M. Bonacci, D. S. Bredt, S. Li, W. R. Bensch, D. E. Moller, M. Kowala, R. J. Konrad and G. Cao** (2008). "Identification and characterization of a major liver lysophosphatidylcholine acyltransferase." *J Biol Chem* **283**(13): 8258-8265.

- Zheng, Y., B. Gao, L. Ye, L. Kong, W. Jing, X. Yang, Z. Wu and L. Ye** (2005). "Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response." *J Microbiol* **43**(6): 529-536.
- Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D. R. Burton, S. F. Wieland, S. L. Uprichard, T. Wakita and F. V. Chisari** (2005). "Robust hepatitis C virus infection in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(26): 9294-9299.
- Zona, L., J. Lupberger, N. Sidahmed-Adrar, C. Thumann, H. J. Harris, A. Barnes, J. Florentin, R. G. Tawar, F. Xiao, M. Turek, S. C. Durand, F. H. Duong, M. H. Heim, F. L. Cosset, I. Hirsch, D. Samuel, L. Brino, M. B. Zeisel, F. Le Naour, J. A. McKeating and T. F. Baumert** (2013). "HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex." *Cell Host Microbe* **13**(3): 302-313.

Annexes

1- Communications dans des congrès nationaux et internationaux

2- A Plant-Derived Flavonoid Inhibits Entry of All HCV Genotypes Into Human Hepatocytes

SIBYLLE HAID,* ALEXANDRA NOVODOMSKÁ,^{‡,§} JULIANE GENTZSCH,* CHRISTINA GRETHE,* SILVIA GEUENICH,_~ DOROTHEA BANKWITZ,* PATRICK CHHATWAL,* BEATE JANNACK,[‡] THIERRY HENNEBELLE,[¶] FRANCOIS BAILLEUL,[¶] OLIVER T. KEPPLER,_~ MARION POENISCH,[#] RALF BARTENSCHLAGER,[#] CÉLINE HERNANDEZ,** MATTHIEU LEMASSON,** ARIELLE R. ROSENBERG,** FLOSSIE WONG–STAAL,^{‡‡} ELISABETH DAVIOUD–CHARVET,^{‡,§} and THOMAS PIETSCHMANN

3- IDENTIFICATION OF A NEW 4-AMINOQUINOLINE DERIVATIVE AS AN INHIBITOR OF HEPATITIS C VIRUS

THIBAUT VAUSSELIN¹, MATTHIEU LEMASSON², MURIEL LAVIE¹, KARIN SERON¹, SANDRINE BELOUZARD¹, LUCIE FENEANT¹, ADELIN DANNEELS¹, LAURENCE COCQUEREL¹, ARIELLE ROSENBERG², PATRICIA MELNYK^{3#}, JEAN DUBUISSON^{1#}

4- Quercetin impairs hepatitis C viral life-cycle steps from assembly to replication

ÁNGELA ROJAS¹, JOSE A. DEL CAMPO¹, SOPHIE CLEMENT², MATTHIEU LEMASSON³, MARTA GARCIA-VALDECASAS¹, ISIDORA RANCHAL¹, ARIELLE R. ROSENBERG³, BIRKE BARTOSCH⁶, JUAN BAUTISTA⁵, FRANCESCO NEGRO^{2,4}, MANUEL ROMERO-GOMEZ¹

Communications dans des congrès nationaux et internationaux :

➤ **21st International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses
(HCV 2014) BANFF, CANADA, September 7-11 2014**

Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 is downregulated by hepatitis C virus: impact on production of lipo-viro-particles (**Présentation orale, Travel Award**)

Matthieu Lemasson[†], Frauke Beilstein[†], Véronique Pène, Sylvie Demignot[‡], Arielle R. Rosenberg[‡]

† or ‡: contributed equally to this work

➤ **75^{èmes} Journées Scientifiques de l'Association Française pour l'Etude du Foie
(AFEF) PARIS, FRANCE, September 24-27 2014**

Le virus de l'hépatite C diminue l'expression de la lysophosphatidylcholine acyltransférase 1 : impact sur la production de lipo-viro-particules (**Présentation orale**)

Frauke Beilstein[†], Matthieu Lemasson[†], Véronique Pène, Arielle R. Rosenberg[‡], Sylvie Demignot[‡]

† or ‡: contributed equally to this work

➤ **65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases
(The Liver Meeting 2014) BOSTON, MA, USA, November 7-11 2014**

Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 is downregulated by hepatitis C virus: impact on production of lipo-viro-particles (Poster)

Frauke Beilstein[†], Matthieu Lemasson[†], Véronique Pène, Arielle R. Rosenberg[‡], Sylvie Demignot[‡]

† or ‡: contributed equally to this work

Published in [Hepatology 2014, vol.60, hep.27531 \(DOI: 10.1002/hep.27531\)](#)

➤ **15^{ème} Réunion du Réseau National Hépatites
PARIS, FRANCE, January 29-30 2015**

Le virus de l'hépatite C diminue l'expression de la lysophosphatidylcholine acyltransférase 1 (LPCAT1): impact sur la production de lipo-viro-particules (**Présentation orale**)

Frauke Beilstein[†], Matthieu Lemasson[†], Véronique Pène, Arielle R. Rosenberg[‡], Sylvie Demignot[‡]

† or ‡: contributed equally to this work

➤ **17^{èmes} Journées Francophones de Virologie
PARIS, FRANCE, April 9-10 2015**

Le virus de l'hépatite C (VHC) diminue l'expression de la lysophosphatidylcholine acyltransférase 1 (LPCAT1) : impact sur la production de lipo-viro-particules (Poster)

Frauke Beilstein[†], Matthieu Lemasson[†], Véronique Pène, Arielle R. Rosenberg[‡], Sylvie Demignot[‡]

† or ‡: contributed equally to this work

➤ **50th International Liver Congress 2015**

(EASL 2015) VIENNA, AUSTRIA, April 22-26 2015

Knockdown of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) increases both the secretion of very-low-density lipoproteins (VLDL) and the infectivity of hepatitis C virus (HCV)

(Poster, **Full Young Investigator Bursary**)

Matthieu Lemasson[†], Frauke Beilstein[†], Véronique Pène, Arielle R. Rosenberg[‡], Sylvie Demignot[‡]

† or ‡: contributed equally to this work

Published in *J Hepatol. 2015, vol.62, supplement n°2, S581 (DOI: [10.1016/S0168-8278\(14\)00825-3](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(14)00825-3))*

➤ **15th International Symposium on Viral Hepatitis & Liver Disease**

(ISVHLD 2015) BERLIN, GERMANY, June 26-28 2015

Hepatitis C virus infection downregulates lysophosphatidylcholine acyltransferase 1: a mechanism linking hepatic steatosis and production of lipo-viro-particles (**Présentation orale, Travel Award**)

Matthieu Lemasson[†], Frauke Beilstein[†], Véronique Pène, Arielle R. Rosenberg[‡], Sylvie Demignot[‡]

† or ‡: contributed equally to this work

Published in *J. Viral. Hepatitis. 2015, vol.22, suppl. S2 (DOI: [10.1111/jvh.15_12424](https://doi.org/10.1111/jvh.15_12424))*

➤ **77^{èmes} Journées Scientifiques de l'Association Française pour l'Etude du Foie**

(AFEF) TOULOUSE, FRANCE, September 30 – October 3 2015

Réévaluation en hépatocytes humains primaires du rôle de la voie de biogenèse des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) dans la production de virus de l'hépatite C (VHC)

(**Présentation orale, Bourse Jeune Chercheur**)

Véronique Pène, Maxime Villaret, Matthieu Lemasson, Lynda Aoudjehane, Jean-François Meritet, Filoména Conti, Yvon Calmus, Arielle R. Rosenberg

➤ **22nd International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses**

(HCV 2015) STRASBOURG, FRANCE, October 9-13 2015

Reassessing the role of very-low-density lipoprotein (VLDL) biogenesis in HCV morphogenesis in primary human hepatocytes (Poster, **Travel Award**)

Véronique Pène, Maxime Villaret, Matthieu Lemasson, Lynda Aoudjehane, Jean-François Meritet, Filoména Conti, Yvon Calmus, Arielle R. Rosenberg

➤ **66th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases**

(The Liver Meeting 2015) SAN FRANCISCO, CA, USA, November 13-17 2015

Role of very-low-density lipoprotein (VLDL) biogenesis in hepatitis C virus (HCV) production: a reassessment in primary human adult hepatocytes (Poster)

Véronique Pène, Maxime Villaret, Matthieu Lemasson, Lynda Aoudjehane, Jean-François Meritet, Filoména Conti, Yvon Calmus, Arielle R. Rosenberg

A Plant-Derived Flavonoid Inhibits Entry of All HCV Genotypes Into Human Hepatocytes

SIBYLLE HAID,* ALEXANDRA NOVODOMSKÁ,^{‡,§} JULIANE GENTZSCH,* CHRISTINA GRETHE,* SILVIA GEUENICH,^{||} DOROTHEA BANKWITZ,* PATRICK CHHATWAL,* BEATE JANNACK,[‡] THIERRY HENNEBELLE,[¶] FRANCOIS BAILLEUL,[¶] OLIVER T. KEPPLER,^{||} MARION POENISCH,[#] RALF BARTENSCHLAGER,[#] CÉLINE HERNANDEZ,** MATTHIEU LEMASSON,** ARIELLE R. ROSENBERG,** FLOSSIE WONG–STAAL,^{††} ELISABETH DAVIOUD–CHARVET,^{‡,§} and THOMAS PIETSCHMANN*

*Division of Experimental Virology, TWINCORE, Centre for Experimental and Clinical Infection Research; a joint venture between the Medical School Hannover and the Helmholtz Centre for Infection Research, Hannover, Germany; [‡]Centre for Biochemistry, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany; [§]European School of Chemistry, Polymers and Materials, UMR CNRS 7509, University of Strasbourg, Strasbourg, France; ^{||}Department of Infectious Diseases, Virology, [#]Department of Infectious Diseases, Molecular Virology University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany; [¶]Laboratory of Pharmacognosy, EA 4481, University of Lille, Lille, France; **University Paris Descartes, EA 4474 “Hepatitis C Virology”, Paris, France; and ^{††}TherX Pharmaceuticals, Inc, San Diego, California

BACKGROUND & AIMS: Interferon-based therapies for hepatitis C virus (HCV) infection are limited by side effects and incomplete response rates, particularly among transplant recipients. We screened a library of plant-derived small molecules to identify HCV inhibitors with novel mechanisms. **METHODS:** We isolated phenolic compounds from *Marrubium peregrinum* L (*Lamiaceae*). Replication of HCV RNA, virus production, and cell entry were monitored using replicons and infectious HCV. Inhibition of HCV was measured in hepatoma cells and primary human hepatocytes using luciferase reporter gene assays, core enzyme-linked immunosorbent assays, or infectivity titration. We tested the bioavailability of the compound in mice. **RESULTS:** We identified a flavonoid, ladanein (BJ486K), with unreported antiviral activity and established its oral bioavailability in mice. Natural and synthetic BJ486K inhibited a post-attachment entry step, but not RNA replication or assembly; its inhibitory concentration 50% was 2.5 μ m. BJ486K was effective against all major HCV genotypes, including a variant that is resistant to an entry inhibitor; it prevented infection of primary human hepatocytes. Combined administration of BJ486K and cyclosporine A had a synergistic effect in inhibition of HCV infection. **CONCLUSIONS: BJ486K has oral bioavailability and interferes with entry of HCV into cultured human hepatocytes. It synergizes with cyclosporine A to inhibit HCV infection. Its inhibitory effects are independent of HCV genotype, including a variant that is resistant to an entry inhibitor against scavenger receptor class B type I. Flavonoid derivatives therefore might be developed as components of combination therapies because they are potent, broadly active inhibitors of HCV entry that could prevent graft reinfection after liver transplantation.**

Keywords: Antiviral Therapy; Liver Transplantation; Entry Inhibitor; Drug.

Endstage liver disease associated with chronic hepatitis C virus (HCV) infection is a leading indication for liver transplantation.¹ Unfortunately, reinfection of the

donor organ is universal. In fact, 20%–25% of graft recipients develop cirrhosis within 5 years and the survival of HCV-positive patients is lower compared with HCV-negative recipients.^{2,3} Current antiviral treatment of chronic HCV infection is based on pegylated-interferon- α and ribavirin and is limited by side effects and suboptimal response rates, particularly in difficult-to-treat transplant patients.⁴ First generation of directly acting antivirals that target the viral NS3-4A protease have improved treatment options. However, resistance development⁵ and viral genotype-specific efficacy⁶ of these drugs necessitate alternative antiviral treatment options. Therefore, new therapeutics that eliminate chronic virus replication, prevent progression to end-stage liver disease, or preclude reinfection of the donor organ in HCV-associated orthotopic liver transplantation could provide a substantial benefit.

HCV is a highly variable, hepatotropic RNA virus that establishes a chronic infection in the majority of cases. Viral strains are grouped into 6 major genotypes that differ from each other by more than 30% at the nucleotide level.⁷ The variability of HCV permits immune evasion and thus facilitates viral persistence. It is also a challenge for development of specific antiviral therapies active against all viral genotypes and for prevention of drug resistance.

Recently, cell culture systems reproducing the complete replication cycle of HCV have been developed⁸ and used to define novel drug targets and to identify and characterize new antiviral compounds. These studies revealed, for instance, an essential role of 4 host-derived proteins, the scavenger receptor class B type I (SR-BI), CD81, claudin-1, and occludin for productive cell entry by HCV.⁹ In turn, interference with the early steps of HCV infection, which are essential for the spread and maintenance of HCV infection, has emerged as an attractive target for the

Abbreviations used in this paper: CoxV, group B coxsackievirus; CsA, cyclosporine A; EC₅₀, median effective concentration; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; PBS, phosphate-buffered saline; SR-BI, scavenger receptor class B type I; VSV, vesicular stomatitis virus.

© 2012 by the AGA Institute
0016-5085/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.036>

development of novel therapeutic options.¹⁰ In parallel, several natural flavonoids including silibinins, silymarin, and naringenin, which interfere with HCV propagation by targeting the viral polymerase,¹¹ or by alternative mechanisms likely also involving host-derived factors, recently were identified^{12–14} and thus have highlighted compounds with flavonoid scaffold as attractive molecules for HCV drug development. Importantly, HCV liver graft reinfection recently was prevented successfully by silibinin monotherapy.¹⁵ These promising advances prompted us to screen various polyphenolic compounds and glycosides for novel inhibitors of HCV infection.

Material and Methods

Synthesis of BJ486K

The total synthesis of BJ486K was developed according to the known procedure¹⁶ with slight modifications. The full details of the total synthesis will be described in a further article, as part of a physicochemistry analysis. The chemical analysis was in agreement with that of the natural compound, ladanein (Supplementary Figure 1).

Cell Culture

Huh7-Lunet/CD81 cells, a derivative of Huh-7 cells highly permissive for HCV-RNA replication and infection,¹⁷ were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen, Darmstadt, Germany) with 10% fetal bovine serum (FCS Gold; PAA, Coelbe, Germany), 1× nonessential amino acids (Invitrogen), 100 μg/mL streptomycin (Invitrogen), 100 IU/mL penicillin (Invitrogen), 2 mmol/L L-glutamine (Invitrogen), and 750 μg/mL geneticin (Carl Roth, Karlsruhe, Germany).

In Vitro Transcription and Electroporation of Huh7-Lunet/CD81 Cells

In vitro transcripts were generated and transfected using electroporation as described recently.¹⁸

Luciferase Infection Assay

Huh7-Lunet/CD81 cells were infected with reporter virus particles essentially as described recently.¹⁸ Briefly, for inoculation with firefly luciferase reporter virus particles (Luc-Jc1¹⁸) and renilla reporter viruses (JcR-2a¹⁹ and GT1-6, this study), Huh7-Lunet/CD81 cells were seeded at a density of 6×10^4 cells per well of a 12-well plate or 6.6×10^3 cells per well of a 96-well plate 24 hours before inoculation. If not stated otherwise, the virus particles were pretreated with the inhibitors for 1 hour at 37°C. Cells were inoculated for 4 hours at 37°C, viral inoculum was replaced by fresh culture fluid and infection was quantified 48 or 72 hours after virus inoculation using luciferase assays. To this end, cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) and in the case of the Luc-Jc1-infected cells, lysed directly on the plate with 350 μL of cold lysis buffer (0.1% Triton-X100, 25 mmol/L glycylglycine, 15 mmol/L MgSO₄, 4 mmol/L ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, and 1 mmol/L dithiothreitol, pH 7.8) and after addition of the luciferase solution (200 μmol/L luciferin, 25 mmol/L glycylglycine, pH 8) measured for 20 seconds in a luminometer (Lumat LB9507; Berthold, Freiburg, Germany). Cells infected with the renilla reporter virus were lysed in 200 μL lysis buffer (Promega, Mannheim, Germany) and after addition of the luciferase substrate (1 μmol/L of coelenterazin; P.J.K., Kleinblittersdorf, Ger-

many; in PBS) measured for 1 second in a luminometer (Lumat LB9507). The indicated median effective concentration (EC₅₀) was determined by using Sigma Plot software (Systat, Inc, San Jose, CA).

Freeze and Thaw Lysis of HCV-Transfected Cells

Huh7-Lunet/CD81 cells were transfected with Jc1 RNA and seeded on a 6-well plate. Compounds were added 4 hours later. At 48 hours after transfection, cell culture supernatant was harvested and used for measuring the extracellular core amount. Cells were washed once with PBS, scraped, and centrifuged for 5 minutes at 1000×g. Cell pellets were resuspended in 500 μL fresh culture fluid and subjected to 3 cycles of freezing and thawing using liquid nitrogen and a 37°C thermo block. Samples then were centrifuged at 10,000×g for 10 minutes to remove cell debris, and the core amount was measured (intracellular core protein) using the Architect HCV Core AG test (Abbott, Wiesbaden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Cytotoxicity Assay

Cytotoxicity was measured using the CytoTox-Glo cytotoxicity assay (Promega) as described by the manufacturer using a plate luminometer Centro XS LB960 (Berthold) according to the manufacturer's instructions.

Determination of Antiviral Activity Against Early Steps of HCV Cell Entry

JcR-2a virus particles were incubated with Huh7-Lunet/CD81 cells seeded as described earlier for 1 hour at 4°C to synchronize cell entry. Various inhibitors including 50 μg/mL heparin (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), CD81-specific antibody JS-81 (2 μg/mL; Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), ITX 5061 (10 μmol/L), or BJ486K (20 μmol/L), were added during virus inoculation (protocol 1), or at indicated time points after virus inoculation (protocols 2–8). After 4 hours of inhibitor treatment, medium was changed to fresh culture fluid without inhibitors and the cells were lysed 48 hours after inoculation as described earlier. Efficiency of infection was determined by luciferase assay using a tube luminometer (Lumat LB9507).

Immunohistochemical Staining and Virus Titration

Virus titers were measured using the limiting dilution assay as described recently.²⁰ Virus titers (50% tissue culture infective dose/mL) were calculated based on the method of Spearman²¹ and Kärber.²²

Infection of Primary Human Hepatocytes

Normal-appearing liver tissue from patients seronegative for HCV, hepatitis B virus, and human immunodeficiency virus (HIV) was obtained from adult patients undergoing partial hepatectomy for the therapy of metastases. Experimental procedures were performed in accordance with French laws and regulations. Hepatocytes were isolated by a 2-step perfusion technique and maintained in primary culture as described previously.²³ Cells were inoculated with Con1/C3-HCV²⁴ grown in Huh-7.5.1 cells at a multiplicity of infection of 0.1 in the presence of dimethyl sulfoxide as carrier control, or else increasing concentrations of BJ486K. Three days later, infectivity titers in culture supernatants as well as HCV-RNA amounts were determined by focus-formation assay or quantitative reverse-

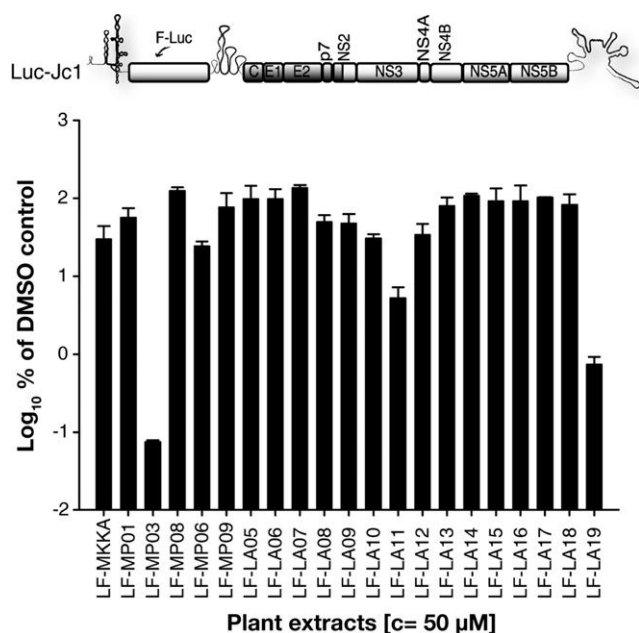


Figure 1. Screening of plant-derived compounds for antiviral activity against HCV. A schematic drawing of the Luc-Jc1 reporter virus genome¹⁸ used for the screening is depicted at the top. Huh7-Lunet/CD81 cells were inoculated overnight with Luc-Jc1-containing preparations in the presence or absence of given extracts. HCV infection efficiency was determined 72 hours after inoculation using luciferase assays and is expressed as the percentage of dimethyl sulfoxide (DMSO) control. Mean values of quadruplicates including the standard deviation are shown.

transcription polymerase chain reaction analysis, respectively, as previously described.^{23,25}

Results

Identification of a Flavonoid With Antiviral Activity Against HCV

To identify novel bioactive molecules with antiviral activity, a bio-guided fractionation was performed starting from a *Lamiaceae* plant, a *Marrubium* species reported

to be rich in flavone aglycones, flavone glycosides, coumaroylated flavone glycosides, and acteoside-related phenylethanoids.²⁶ Natural phenolic compounds were isolated from plant extracts of *Marrubium peregrinum* L (*Lamiaceae*) (Supplementary Figure 2), and anti-HCV activity of these extracts was evaluated by inoculation of the highly permissive human hepatoma cell line Huh7-Lunet/CD81¹⁷ with firefly luciferase reporter viruses based on the intragenotypic genotype 2a chimera Jc1 in the presence of the compounds (Luc-Jc1¹⁸; Figure 1). Among all tested extracts, LF-LA19 and LF-MP03, which comprise large quantities of 2 closely related flavonoids (tricine-7-glucoride and ladanein, respectively), inhibited HCV cell entry and/or RNA replication by more than 99% or 99.9%, respectively. To confirm that ladanein, the dominant flavonoid present in extract MP03, exclusively was responsible for the observed antiviral activity against HCV, we synthesized ladanein and compared the antiviral activity of the synthetic compound, designated BJ486K, with the one from the natural source. The structure and purity of synthetic BJ486K was confirmed by nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry, elemental analysis (Supplementary Figure 1), and radiocrystallography (data not shown). Both MP03 as well as BJ486K inhibited infection and/or RNA replication by the genotype 2a luciferase reporter virus in a dose-dependent fashion (Figure 2A). The EC₅₀ (Figure 2A) and toxic dose 50% (Figure 2B) were comparable between MP03 (EC₅₀, 2.79 µmol/L; toxic dose 50%, 90.03 µmol/L) and BJ486K (EC₅₀, 2.54 µmol/L; toxic dose 50%, 98.04 µmol/L), providing evidence that BJ486K is the active component within the plant-derived extract MP03. These data show that the flavone BJ486K efficiently inhibits HCV entry, RNA translation, and/or replication.

BJ486K Inhibits HCV Cell Entry but Not RNA Replication or Virus Production

Our screening assay does not distinguish which step of the HCV replication cycle is affected by a given

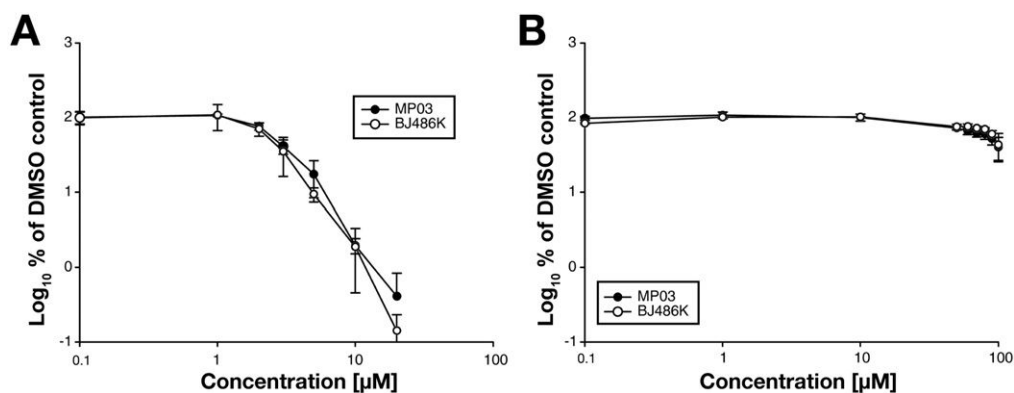


Figure 2. Antiviral activity of BJ486K. (A) Huh7-Lunet/CD81 cells were inoculated for 48 hours with Luc-Jc1 virus particles in the presence of increasing doses of MP03 or BJ486K, respectively. HCV infection and replication efficiency was determined 48 hours after inoculation using luciferase assays and is expressed as the percentage of cells treated with solvent alone. Mean values of 3 independent experiments each with quadruplicate measurements including the standard deviation are shown. (B) Huh7-Lunet/CD81 cells were cultured for 48 hours in the presence of increasing doses of MP03 or BJ486K, respectively. Cell viability was determined using a commercial cytotoxicity assay (CytoToxGlo; Promega) and is expressed relative to cells treated with dimethyl sulfoxide (DMSO). Mean values of 3 independent experiments each with quadruplicate measurements including the standard deviation are shown.

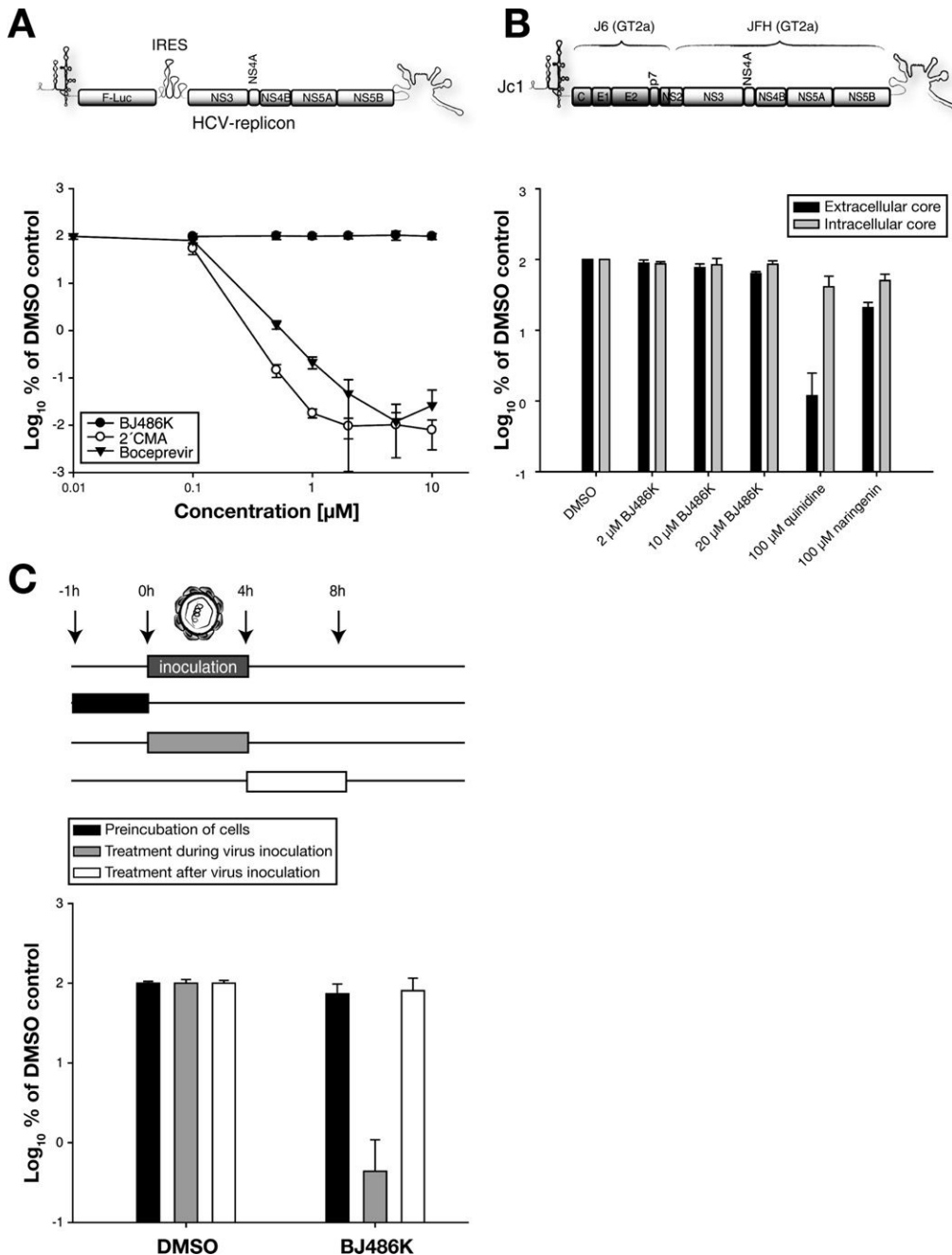


Figure 3. BJ486K selectively inhibits HCV cell entry. (A) Huh7-Lunet/CD81 cells were transfected with the subgenomic luciferase replicon depicted at the top. Drugs were added 4 hours after transfection and the level of HCV-RNA translation and RNA replication was quantified by luciferase assays 72 hours after transfection. Mean values of 3 independent experiments each with quadruplicate measurements including the standard deviation are shown. (B) Cells were transfected with the Jc1 chimera depicted above and drugs were added 4 hours later. HCV virus release in the presence or absence of given compounds was determined by quantification of intracellular and extracellular core protein levels using a core-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Mean values of 3 independent experiments with single measurements including the error range are given. (C) Huh7-Lunet/CD81 cells were inoculated with Luc-Jc1 reporter viruses prepared in the absence of drugs. BJ486K was added to the cells only before inoculation (black), only during inoculation (grey), or selectively directly after inoculation (white) as schematically depicted at the top. Infectivity was determined 72 hours later by luciferase assays and compared with dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated controls. Mean values of 3 independent experiments each with quadruplicate measurements including the standard deviation are shown.

compound. Therefore, to characterize the antiviral effect of BJ486K, we next assessed the impact of BJ486K on the steps of HCV-RNA translation and replication. To this end, we transfected Huh7-Lunet/CD81 cells with a subgenomic JFH1 luciferase replicon and monitored RNA replication 72 hours later by luciferase assays. As control we incubated the cells with increasing doses of the NS3-4A protease inhibitor boceprevir and the polymerase inhibitor 2'-C-methyladenosine. As shown in Figure 3A, BJ486K affected neither RNA translation nor replication of HCV RNA because luciferase activity was not changed up to a dose of 10 $\mu\text{mol/L}$.

To determine whether BJ486K affects virus assembly or release, we transfected Huh7-Lunet/CD81 cells with Jc1

RNA and quantified intracellular and extracellular levels of core protein 48 hours after transfection (Figure 3B). As expected, both quinidine and the grapefruit flavonoid naringenin, 2 assembly inhibitors recently identified using the JFH1-based infection system,^{14,27} selectively reduced extracellular levels of core protein by more than 100- or approximately 5-fold, respectively, thus confirming their interference with HCV virus production. In contrast, BJ486K reduced neither intracellular nor extracellular core protein levels up to a dose of 20 $\mu\text{mol/L}$, which is 10-fold higher than the determined EC_{50} value (Figure 2). Collectively, these data indicate that different flavonoids can prevent HCV propagation by distinct mechanisms and that BJ486K does not impede HCV-RNA translation,

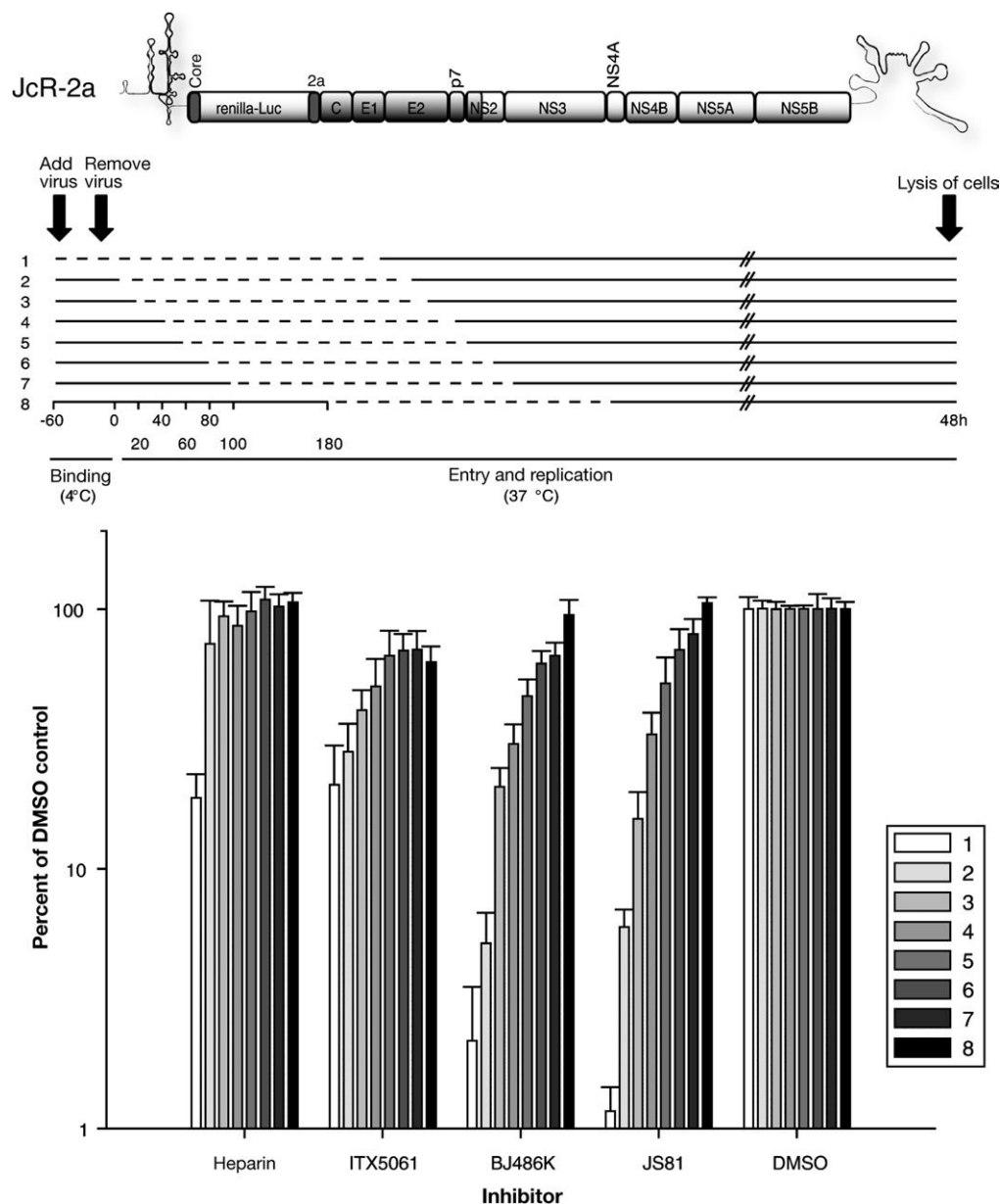


Figure 4. BJ486K inhibits cell entry after virus attachment. The design of the JcR-2a reporter virus construct is given at the *top*. Huh7-Lunet/CD81 cells were inoculated with concentrated JcR-2a particles at 4°C for 60 minutes. Subsequently, unbound virus particles were washed away and cells were shifted to 37°C to permit synchronized cell entry. According to the 8 experimental protocols depicted in the *middle*, various cell entry inhibitors including heparin (50 μ g/mL), ITX5061 (10 μ mol/L), CD81-specific antibody JS-81 (2 μ g/mL), and BJ486K (20 μ mol/L) were either present during inoculation (protocol 1) or were added at different time points after inoculation (protocols 2–8). In each case, inhibitor was present for 4 hours (*dashed line*) and then was washed away. Efficiency of cell entry was determined 48 hours after inoculation by determination of luciferase activity and is expressed relative to control infections conducted in the presence of solvent alone (dimethyl sulfoxide [DMSO]). Mean values of 3 independent experiments each with quadruplicate measurements including the standard deviation are shown.

RNA replication, or virus production. In agreement with this conclusion, addition of BJ486K only interfered with HCV infection when the drug was present during virus inoculation, whereas addition of the compound before or after virus inoculation did not preclude productive cell entry and subsequent RNA replication (Figure 3C).

BJ486K Interferes With a Post-attachment Step of HCV Cell Entry

To resolve which step of HCV cell entry is inhibited by BJ486K, we assessed its antiviral activity when administered at different time points during the early phase of infection. To this end, Huh7-Lunet/CD81 cells were inoculated for 1 hour at 4°C with a reporter virus prepared in the absence of drugs. At this temperature, virus particles bind to the cell surface but do not efficiently enter, thus permitting a rather synchronous infection when the inoculum is removed and cells are shifted to 37°C. A selection

of HCV entry inhibitors that prevent infection by different mechanisms or BJ486K were added during inoculation, directly afterward or at different intervals shortly thereafter. To attain maximal sensitivity we used a novel monocistronic renilla luciferase reporter virus based on the intragenotypic genotype 2a chimera Jc1, which is designated *JcR-2a*, and recently was described¹⁹ (Figure 4). As expected, heparin, which is known to impede HCV cell attachment,¹⁸ only interfered with HCV infection when present already during inoculation (Figure 4). In contrast, BJ486K, similar to CD81-specific antibodies, potently inhibited entry not only when present during inoculation but also when added directly after virus binding (>90% inhibition). In fact, administration of the drug 20 minutes after virus attachment still inhibited approximately 80% of HCV infection, clearly indicating that BJ486K blocks a postbinding step of the HCV entry pathway. The kinetics

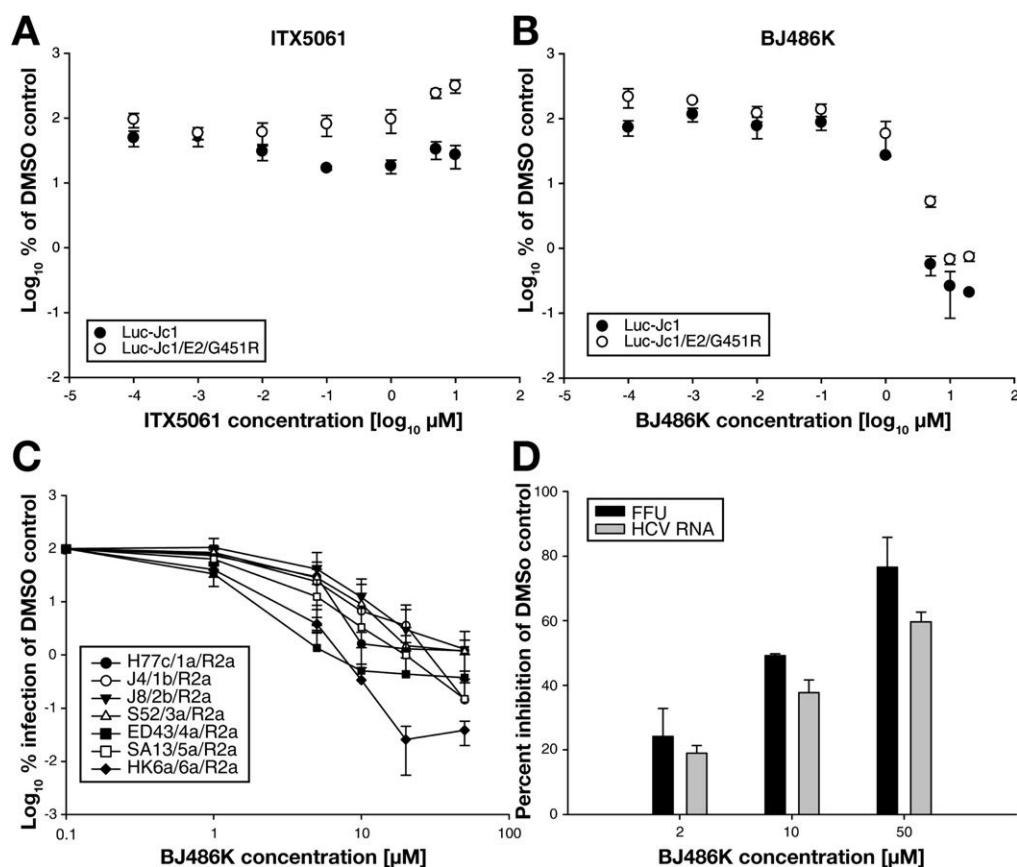


Figure 5. BJ486K is not affected by viral resistance toward an SR-BI-targeting compound, inhibits HCV of different genotypes, and prevents infection of primary human hepatocytes. Huh7-Lunet/CD81 cells were inoculated with Luc-Jc1 or Luc-Jc1/E2/G451R reporter viruses in the presence of increasing doses of (A) ITX 5061 or (B) BJ486K. Cells were lysed 72 hours later. Luciferase activity was determined and is expressed relative to control infections conducted in the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO). Mean values of 4 independent experiments each with quadruplicate measurements including the standard deviation are shown. (C) Huh7-Lunet/CD81 cells were inoculated with genotypes 1a, 1b, 2b, 3a, 4a, 5a, and 6a chimeric reporter viruses in the presence of increasing doses of BJ486K. Luciferase activity was determined 72 hours later and is expressed relative to infections in the presence of DMSO. Mean values of 3 independent experiments, each with triplicate measurements, are given. (D) Primary human hepatocytes were inoculated with Con1/C3 in the presence of DMSO or increasing concentrations of BJ486K. The inhibition of HCV infection was assessed by focus-formation assay (*black*) or by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis (*grey*) and is expressed as the percentage of inhibition relative to DMSO-treated cells. Mean values of duplicate measurements including the error range are given.

of BJ486K-mediated blockade of HCV cell entry were comparable with CD81-specific antibodies and also with ITX5061, a clinical stage compound that is thought to interfere with HCV infection through inhibiting viral interaction with SR-BI.²⁸

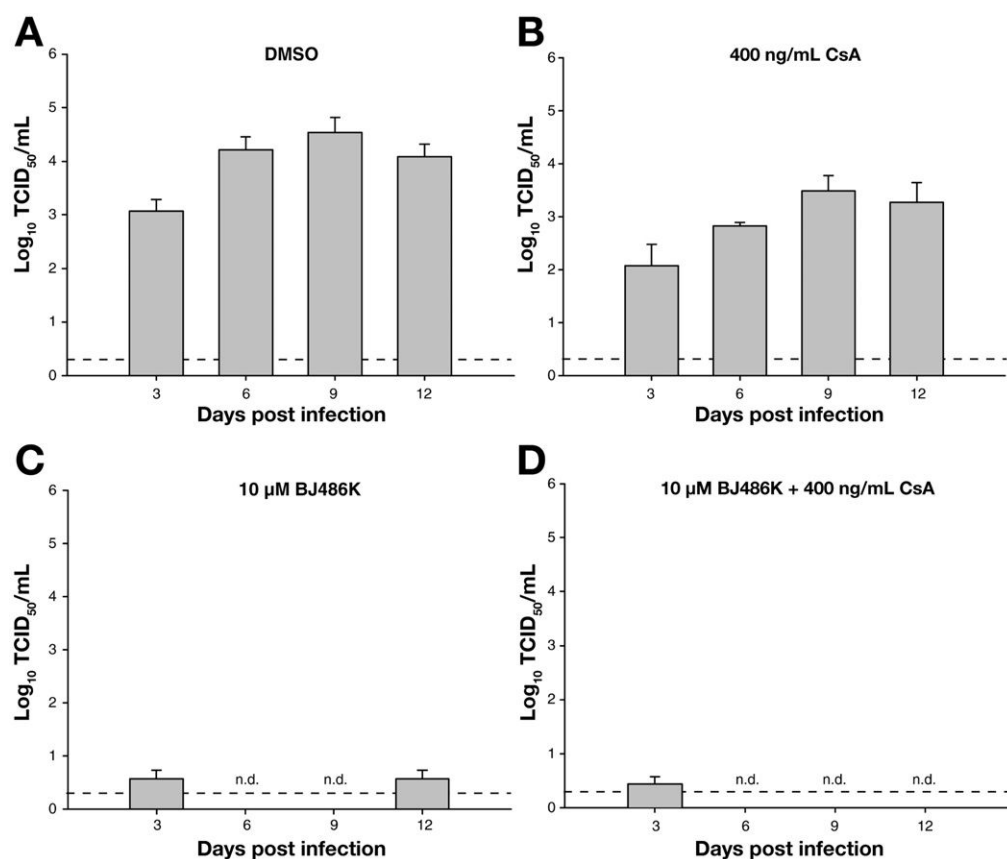
BJ486K Is Not Affected by Viral Resistance Against an SR-BI-Targeting Entry Inhibitor, Inhibits HCV of All Major Genotypes, and Impedes Infection of Primary Human Hepatocytes

Syder et al²⁸ recently reported that a specific mutation within the HCV envelope protein E2 (G451R) that is known to reduce viral dependency on SR-BI for cell entry²⁹ at the same time reduces the susceptibility of HCV toward inhibition by ITX5061. These data indicate that decrease of SR-BI-receptor dependence by HCV is a possible viral escape mechanism from inhibition by SR-BI-targeting antivirals. Therefore, to explore whether this viral resistance mechanism also compromises the antiviral

activity of BJ486K we compared the antiviral activity of the 2 compounds against wild-type and the mutant virus carrying the G451R exchange within E2. In line with the report by Syder et al,²⁸ the aforementioned mutation rendered HCV resistant to inhibition by ITX5061 (Figure 5A). In contrast, the antiviral activity of BJ486K was not changed by this mutation (Figure 5B), indicating that reduced SR-BI dependence does not confer resistance toward entry inhibition by BJ486K.

Efficacy of current HCV treatment is influenced substantially by viral genotype. More specifically, interferon-based therapy regimens attain sustained viral response rates of approximately 80% in patients infected with genotype 2 and 3 viruses, whereas response rates among patients chronically infected with genotype 1 only reach about 50%.³⁰ Moreover, directly targeted antivirals in late-stage clinical development vary in efficacy depending on the viral genotype. Therefore, we determined the antiviral activity of BJ486K toward HCV particles from different

Figure 6. Combination therapy of BJ486K and CsA prevents infection of differentiated human hepatoma cells. Huh7-Lunet/CD81 cells were differentiated by treatment with 1% DMSO as described recently.³¹ Subsequently, cells were challenged with Jc1 in the presence of (A) dimethyl sulfoxide (DMSO), (B) CsA, (C) BJ486K, or (D) a combination of CsA and BJ486K. Culture fluids of the inoculated cells were collected at 3, 6, 9, and 12 days after inoculation and the infectivity of released virus particles was determined by a limiting dilution assay (nd, not detectable). Dotted line depicts the measurement background of the assay.



genotypes. To be able to resolve different response rates among these viruses with highest resolution, we created a set of novel reporter virus constructs based on the JcR-2a backbone (Figure 4). Importantly, antiviral activity of BJ486K against cell culture-derived particles from genotypes 1a, 1b, 2b, 3a, 4a, 5a, and 6a was comparable and showed an EC_{50} less than $4.2 \mu\text{mol/L}$, indicating that BJ486K inhibits HCV cell entry independently of viral genotype or subtype (Figure 5C and Supplementary Table 1).

Although human hepatocellular carcinoma-derived cell lines sustain the entire HCV replication cycle and are a well-accepted model for HCV infection studies, these cells nevertheless functionally differ from primary human hepatocytes. Therefore, to confirm the antiviral activity of BJ486K in a more natural system, primary human hepatocytes were inoculated in the presence or absence of BJ486K with a cell culture-derived genotype 1b virus (Con1/C3²⁴). As shown in Figure 5D, Con1/C3 infection of primary human hepatocytes was inhibited by BJ486K in a dose-dependent fashion with an EC_{50} value of approximately $10 \mu\text{mol/L}$.

BJ486K Exerts Synergistic Antiviral Activity With Cyclosporine A and Prevents Productive Infection of Differentiated Human Hepatoma Cells

Next, we investigated if combination of cyclosporine A (CsA), an inhibitor of HCV-RNA replication in vitro and in vivo and also an immunosuppressive drug used in

the HCV post-transplant setting, with BJ486K would increase antiviral potency. To this end, we challenged Huh7-Lunet/CD81 cells differentiated by dimethyl sulfoxide treatment³¹ with the highly infectious Jc1 chimera in the presence of CsA, BJ486K, or a combination of both drugs (Figure 6). In this quiescent, growth-arrested cell culture we monitored virus production for 12 days after inoculation to find out if drug treatment had completely eliminated virus infection. The applied dose of CsA was not sufficient to prevent infection of the cells and resulted in only about 5- to 10-fold lower levels of infectious virus 12 days after inoculation (Figure 6B). In contrast, BJ486K reduced infection almost down to background levels (Figure 6C). Remarkably, a combination of both drugs completely eliminated infection as was evident from the absence of detectable infectious virus at days 6, 9, and 12 after inoculation (Figure 6D). To obtain a more quantitative measure for the combined antiviral effect of BJ486K and CsA, we inoculated naive Huh7-Lunet/CD81 cells with JcR-2a virus together with varying doses of both drugs (Figure 7A). Importantly, addition of $1 \mu\text{mol/L}$ of BJ486K decreased the EC_{50} of CsA by more than 10-fold (Figure 7A, left panel) and vice versa, as little as 100 ng/mL of CsA decreased the EC_{50} of BJ486K by approximately 3-fold to approximately 400 nmol/L . To further analyze the drug-drug interaction, we examined the combined antiviral activity over a broad range of concentrations for both inhibitors ($7.81\text{--}2000 \text{ ng/mL}$ for CsA and $0.31\text{--}10$

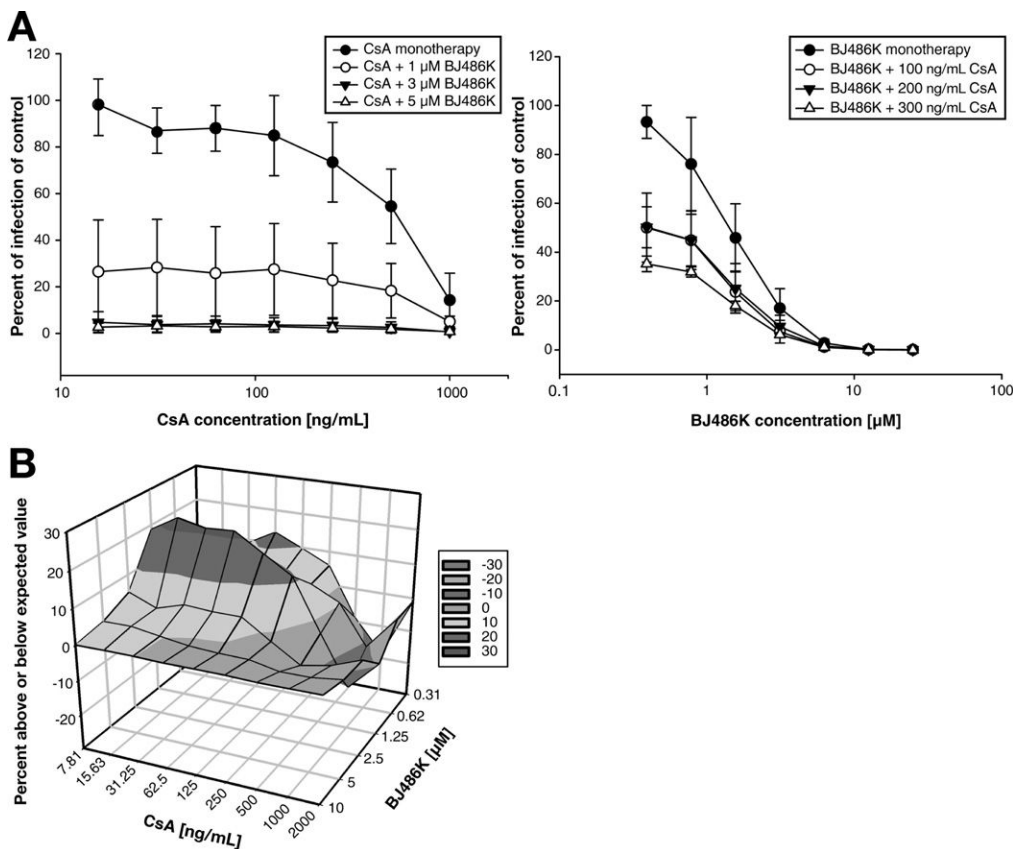


Figure 7. Synergistic antiviral activity of BJ486K and CsA. (A) Combined effects of CsA on BJ486K and vice versa were analyzed by inoculation of Huh7-Lunet/CD81 cells with JcR-2a virus in the presence of given drugs and determination of luciferase activity 72 hours later. Mean values of 3 independent experiments each conducted in triplicate including the standard deviations are given. Data are normalized for values determined in mock-treated controls. (B) Antiviral effect of CsA and BJ486K drug combinations in Huh7-Lunet/CD81 cells. The dose ranges of CsA and BJ486K are given. Shading indicates different ranges above or below the expected value. A volume below the zero plane indicates an antagonistic effect, a volume above the plane a synergistic effect.

μ mol/L for BJ486K). By using the method of Prichard and Shipman³² we observed that specifically low doses of both drugs resulted in an antiviral activity above the expected value, indicating that BJ486K and CsA synergistically inhibited HCV infection (Figure 7B). Of note, pharmacokinetic data of BJ486K administered to mice indicate bioavailability of the drug and peak plasma levels of 329 nmol/L after a single oral dose of 0.25 mg/kg (Supplementary Figure 3). Collectively, these results indicate that a combination of these inhibitors dramatically increases antiviral potency that is sufficient to prevent infection of cultured cells with a high dose of infectious HCV.

Discussion

Screening a library of plant-derived extracts, we identified a flavone with potent antiviral activity against HCV. Further mechanistic studies indicated that the natural compound as well as the synthetic molecule designated BJ486K prevent HCV cell entry by blocking a post-attachment step. Antiviral activity was confirmed in primary human hepatocytes, it was independent of viral genotype and was not affected by a recently described viral resistance mechanism that decreases efficacy of SR-BI-targeting compounds. Importantly, combination of BJ486K with CsA synergistically increased antiviral potency and prevented successful infection of cultured cells with a high dose of infectious HCV. Recently, Firpi et al³³ compared use of CsA with tacrolimus in HCV liver transplant recipients undergoing

antiviral therapy and observed a modest decrease of viral RNA and increased antiviral response to pegylated interferon- α and ribavirin in the CsA-based regimen of immunosuppression. Although the study was small, these data nevertheless suggested some antiviral benefit to use of CsA. Notably, a more recent retrospective comparison between CsA and tacrolimus in the HCV transplant setting involving more than 8000 patients reported a better long-term outcome for patients receiving tacrolimus.³⁴ Although the molecular mechanism underlying this result is unclear, it argues that antiviral effects of CsA are outweighed by beneficial characteristics of tacrolimus in the long term. Nevertheless, transient regimens in the early phase after liver transplantation involving CsA and including cell entry inhibitors, for instance, BJ486K, may prevent HCV recurrence. Subsequently, immunosuppression could be switched to tacrolimus for further improving chances of graft survival.

HCV cell entry is a complex multistep process that involves at least 4 cell type-specific entry factors (CD81, SR-B1, claudin-1, and occludin). Because ectopic expression of these proteins in human and nonhuman cells renders them permissive for HCV infection, it seems that additional important cellular proteins are highly conserved and ubiquitously expressed. Collectively, these in part cell type-specific host components mediate virus attachment and endocytosis via clathrin-coated vesicles. Ultimately, a low pH-induced fusion mechanism permits viral escape from endosomes and access of the viral ge-

nome to the cytoplasm for subsequent steps of HCV RNA translation and RNA replication. Although the precise role of entry factors during infection is incompletely understood, interference with the use of these proteins by HCV has emerged as an attractive approach for development of novel therapeutics. In fact, antibodies specifically targeting CD81 have been shown to prevent infection of humanized mice when administered before viral challenge.³⁵ These encouraging data suggest that modalities preventing virus cell entry could be used in the future to prevent reinfection of liver graft after HCV-associated liver transplantation. Moreover, also in chronically infected patients, entry inhibitors could complement future therapeutic regimens by preventing de novo infection of host cells, thus contributing to viral clearance.

Our data indicate that BJ486K prevents HCV life-cycle steps subsequent to virus binding and before viral RNA translation and RNA replication. Thus, receptor interactions, virus endocytosis, or membrane fusion could be inhibited. Considering the antiviral activity of BJ486K against all HCV genotypes, we analyzed if it inhibits infection by alternative viruses unrelated to HCV (Supplementary Figure 4). Interestingly, BJ486K interfered with infection by vesicular stomatitis virus (VSV) and HIV-1, but not group B coxsackievirus (CoxV) and adenovirus type 5 (AdV5). These data indicate that BJ486K has a broad-spectrum antiviral activity inhibiting infection by enveloped virus particles (HCV, HIV-1, VSV), but not by virus particles without lipid membrane (CoxV, AdV5). Given these results it is unlikely that BJ486K interferes with HCV infection by preventing specific HCV-receptor interactions. Instead, this compound likely precludes entry steps that are shared or reasonably conserved between HCV, HIV-1, and VSV, but fundamentally different from CoxV and AdV5 entry mechanisms. In this regard, virus-cell fusion, which is mediated by viral fusion proteins operating through shared mechanisms among enveloped viruses and modulating membrane properties of host and viral membranes, may be a candidate target for BJ486K. It will be interesting to find out if BJ486K inhibits cell fusion of HCV and other viruses, which chemical properties may confer this inhibitory property, and whether this could be exploited further for development of broadly active antiviral entry inhibitors.

Collectively, our data highlight a novel flavone with potent and broad-spectrum antiviral activity against HCV. These findings should encourage further development of flavone-derived compounds as attractive pan-genotype entry inhibitors for treatment of HCV.

Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at www.gastrojournal.org, and at <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.036>.

References

1. Brown RS. Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 2005; 436:973–978.
2. Berenguer M, Aguilera V, Prieto M, et al. Significant improvement in the outcome of HCV-infected transplant recipients by avoiding rapid steroid tapering and potent induction immunosuppression. *J Hepatol* 2006;44:717–722.
3. Lake JR. Immunosuppression and outcomes of patients transplanted for hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44:627–629.
4. Carrion JA, Navasa M, Garcia-Retortillo M, et al. Efficacy of antiviral therapy on hepatitis C recurrence after liver transplantation: a randomized controlled study. *Gastroenterology* 2007;132:1746–1756.
5. Vermehren J, Sarrazin C. New HCV therapies on the horizon. *Clin Microbiol* 2011;17:122–134.
6. Imhof I, Simmonds P. Genotype differences in susceptibility and resistance development of hepatitis C virus to protease inhibitors telaprevir (VX-950) and danoprevir (ITMN-191). *Hepatology* 2011; 53:1090–1099.
7. Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962–973.
8. Bartenschlager R, Sparacio S. Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Res* 2007;127:195–207.
9. Dubuisson J, Helle F, Cocquerel L. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* 2008;10:821–827.
10. Zeisel MB, Fofana I, Fafi-Kremer S, et al. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J Hepatol* 2011;54:566–576.
11. Ahmed-Belkacem A, Ahnou N, Barbotte L, et al. Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Gastroenterology* 2010;138:1112–1122.
12. Polyak SJ, Morishima C, Lohmann V, et al. Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:5995–5999.
13. Wagoner J, Negash A, Kane OJ, et al. Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology* 2010;51:1912–1921.
14. Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, et al. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 2008;47:1437–1445.
15. Neumann UP, Biermer M, Eurich D, et al. Successful prevention of hepatitis C virus (HCV) liver graft reinfection by silibinin monotherapy. *J Hepatol* 2010;52:951–952.
16. Farkas L, Nogradi M, Sudarsan V, et al. Constituents of iva species .5. isolation structure and synthesis of nevadensin a new flavone from iva nevadensis M E Jones and Iva Acerosa (Nutt) Jackson. *J Organic Chem* 1966;31:3228–3232.
17. Koutsoudakis G, Herrmann E, Kallis S, et al. The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol* 2007;81:588–598.
18. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006;80:5308–5320.
19. Reiss S, Rebhan I, Backes P, et al. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 2011;9:32–45.
20. Steinmann E, Brohm C, Kallis S, et al. Efficient trans-encapsulation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles. *J Virol* 2008;82:7034–7046.
21. Spearman C. The method of “right and wrong cases” (“constant stimuli”) without Gauss’s formulae. *Br J Psychol* 1908;2:227–242.
22. Kärber G. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 1931;162:480–487.

23. Potevin P, Carpentier A, Pene V, et al. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* 2010;139:1355–1364.
24. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7408–7413.
25. Pene V, Hernandez C, Vauloup-Fellous C, et al. Sequential processing of hepatitis C virus core protein by host cell signal peptidase and signal peptide peptidase: a reassessment. *J Viral Hepat* 2009;16:705–715.
26. Hennebelle T, Sahpaz S, Skaltsounis AL, et al. Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Biochem Syst Ecol* 2007;35:624–626.
27. Chockalingam K, Simeon RL, Rice CM, et al. A cell protection screen reveals potent inhibitors of multiple stages of the hepatitis C virus life cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3764–3769.
28. Syder AJ, Lee H, Zeisel MB, et al. Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *J Hepatol* 2011;54:48–55.
29. Grove J, Nielsen S, Zhong J, et al. Identification of a residue in hepatitis C virus E2 glycoprotein that determines scavenger receptor BI and CD81 receptor dependency and sensitivity to neutralizing antibodies. *J Virol* 2008;82:12020–12029.
30. Manns MP, Foster GR, Rockstroh JK, et al. The way forward in HCV treatment—finding the right path. *Nat Rev* 2007;6:991–1000.
31. Sainz B Jr, Chisari FV. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *J Virol* 2006;80:10253–10257.
32. Prichard MN, Shipman C Jr. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. *Antiviral Res* 1990;14:181–205.
33. Firpi RJ, Soldevila-Pico C, Morelli GG, et al. The use of cyclosporine for recurrent hepatitis C after liver transplant: a randomized pilot study. *Digest Dis Sci* 2010;55:196–203.
34. Irish WD, Arcona S, Bowers D, et al. Cyclosporine versus tacrolimus treated liver transplant recipients with chronic hepatitis C: outcomes analysis of the UNOS/OPTN database. *Am J Transplant* 2011;11:1676–1685.
35. Meuleman P, Hesselgesser J, Paulson M, et al. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology*

2008;48:1761–1768.

Received May 31, 2011. Accepted March 20, 2012.

Reprint requests

Address requests for reprints to: Professor Dr Thomas Pietschmann, Division of Experimental Virology, Twincore Center for Experimental and Clinical Infection Research, Feodor-Lynen-Straße 7-9, 30625 Hannover, Germany. e-mail: thomas.pietschmann@twincore.de; fax: (49) 511-220027-139. Or to Professor Dr Elisabeth Davioud-Charvet; European School of Chemistry, Polymers and Materials (ECPM), University of Strasbourg, UMR CNRS 7509, 25, rue Becquerel, F-67087 Strasbourg, France, e-mail: elisabeth.davioud@unistra.fr; fax: +33 (0)3 68 85 27 42.

Acknowledgments

The authors are grateful to Takaji Wakita, Jens Bukh, and Judith Gottwein for providing JFH1 and the infectious chimeric hepatitis C virus constructs used in this work. The authors also thank Charles Rice for Huh-7.5 cells and the 9E10 antibodies, Albert Heim who provided virus stocks of coxsackie virus type B and adenovirus type 5, and Gert Zimmer for providing vesicular stomatitis virus**M*₀. The authors also thank all members of the Department of Experimental Virology for helpful suggestions and discussions. Elisabeth Davioud-Charvet is a delegate of “Centre Nationale de la Recherche Scientifique” in the frame of a French-German cooperation with Heidelberg University, Germany.

Conflicts of interest

This author discloses the following: Thomas Pietschmann received consulting fees from Biotest. The remaining authors disclose no conflicts.

Funding

Supported by grants from the Helmholtz Association SO-024 and HA-202 (T.P.), the Deutsche Forschungsgemeinschaft via the Sonderforschungsbereich 544 (B14 project), and grants from the Centre national de la recherche scientifique (E.D.C.). M.P. was supported by the postdoc program of the medical faculty at Heidelberg University.

Supplementary Material and Methods

Preparation of Plant Extracts and Isolation of Ladanein

Ladanein (MP03) was extracted according to the reported procedures.^{1,2} Briefly, natural phenolic compounds (Supplementary Figure 2) were isolated from plant extracts of *Marrubium peregrinum* L (*Lamiaceae*), after extraction of dried, powdered, flowered aerial parts with dichloromethane at room temperature, evaporation, and lyophilization. The extract underwent gel filtration by Sephadex LH-20 in the biofractionation process. Isolated compounds were purified over Silicagel 60H columns or further Sephadex LH-20 as described previously.² The compounds were identified by nuclear magnetic resonance spectroscopy (Supplementary Figure 1), radiocrystallography, and mass spectrometry. Details regarding the biofractionation process are available upon request.

Plasmids

The plasmids pFK-Luc-Jc1 and pFK-Jc1 encoding the intragenotypic 2a/2a chimeric virus Jc1 with or without firefly luciferase reporter gene^{3,4} as well as the plasmid pFKi389RLuc2aCore-3'-Jc1⁵ (referred to as JcR-2a) have been described. Briefly, JcR-2a is a monocistronic reporter virus derived from the Jc1 chimera⁴ that expresses a renilla luciferase (RLuc) that is fused N-terminally with the 16 N-terminal residues of the core protein. C-terminally RLuc is connected to the Jc1 open reading frame through the foot-and-mouth disease virus 2A peptide coding region that liberates the reporter from the downstream HCV proteins. This construct was used to create infectious monocistronic RLuc reporter virus genomes for all 6 major genotypes. Briefly, chimeric HCV open reading frames encoding core, E1, E2, p7, and NS2 of the GT1a isolate H77,^{6,7} the GT1b isolate Con1,^{8,9} the GT2b isolate J8,⁸ the GT3a isolate S52,¹⁰ the GT4a isolate ED43,⁶ the GT5a isolate SA13,¹¹ or the GT6a isolate HK6a,⁸ respectively, followed by JFH1-derived NS3 to NS5B genes were cloned downstream of the R2a-reporter gene cassette. The resulting novel monocistronic renilla luciferase reporter virus genomes were designated H77/1a/R2a, Con1/1b/R2a, J8/2b/R2a, S52/3a/R2a, ED43/4a/R2a, SA13/5a/R2a, and HK6a/6a/R2a.

Infection Assays With HIV, Vesicular Stomatitis Virus, Adenovirus, and Coxsackievirus

Env-deleted HIV-1-green fluorescent protein (GFP) reporter viruses, which had been pseudotyped with the R5 envelope from YU-2, were incubated with the indicated concentrations of either BJ486K or MP03 (Supplementary Figure 4) for 1 hour at 37°C, in principle as reported.¹² Briefly, TZM-bl cells were challenged with these viruses overnight, washed, and subsequently cultivated under standard conditions. Three days after infec-

tion the percentage of infected, GFP-positive cells was quantified by flow cytometry. Values obtained for solvent-treated controls were set to 100%. Shown are arithmetic means \pm standard deviation ($n = 3$) from 1 of 3 independent experiments. The indicated EC₅₀ values were determined by using Prism software (GraphPad, San Diego, CA).

Replication competent group B coxsackievirus (CoxV) and adenovirus type 5 (AdV5), or a GFP-tagged VSV were incubated with the indicated concentrations of BJ486K for 1 hour at 37°C before infection of Vero-CH, A549, or Huh-7.5 cells, respectively. Virus titers were analyzed using limiting dilution assays. In brief, cells were inoculated with serially diluted virus preparations with 6 replicate wells of a 96-well plate per dilution. Cells were fixed with 3% paraformaldehyde 48–72 hours after infection and in the case of CoxV and AdV5 infection stained with Coomassie solution (0.25% Coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol, 10% acetic acid) to identify infected wells. In case of VSV infections, we used a recombinant vesicular stomatitis virus expressing enhanced green fluorescent protein designated VSV*M_Q.¹³ This virus, kindly provided by Gert Zimmer, carries 4 attenuating mutations in the M protein and expresses GFP from an additional transcriptional unit located between G and L. VSV*M_Q-infected cells were identified by detection of GFP-autofluorescence using an Olympus IX-81 microscope (Olympus, Hamburg, Germany). Virus titers (50% tissue culture infective dose/mL) were calculated based on the method of Spearman¹⁴ and Kärber.¹⁵

Evaluation of Bioavailability in Mice

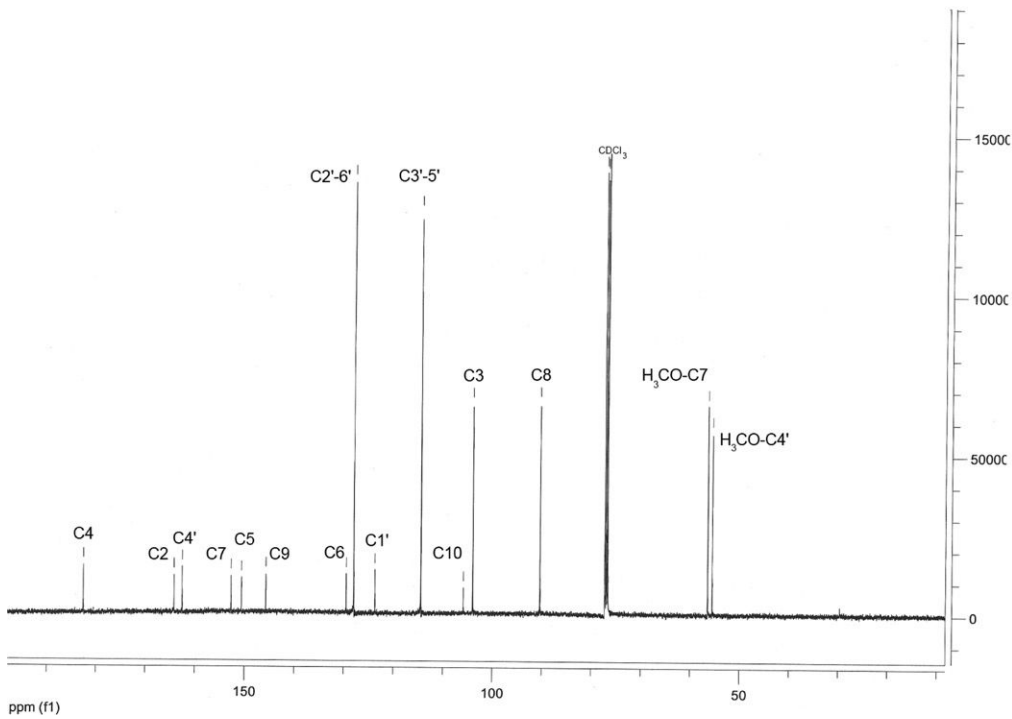
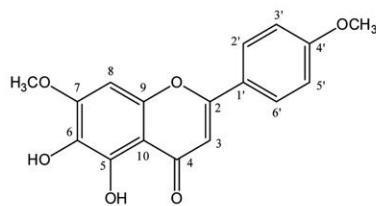
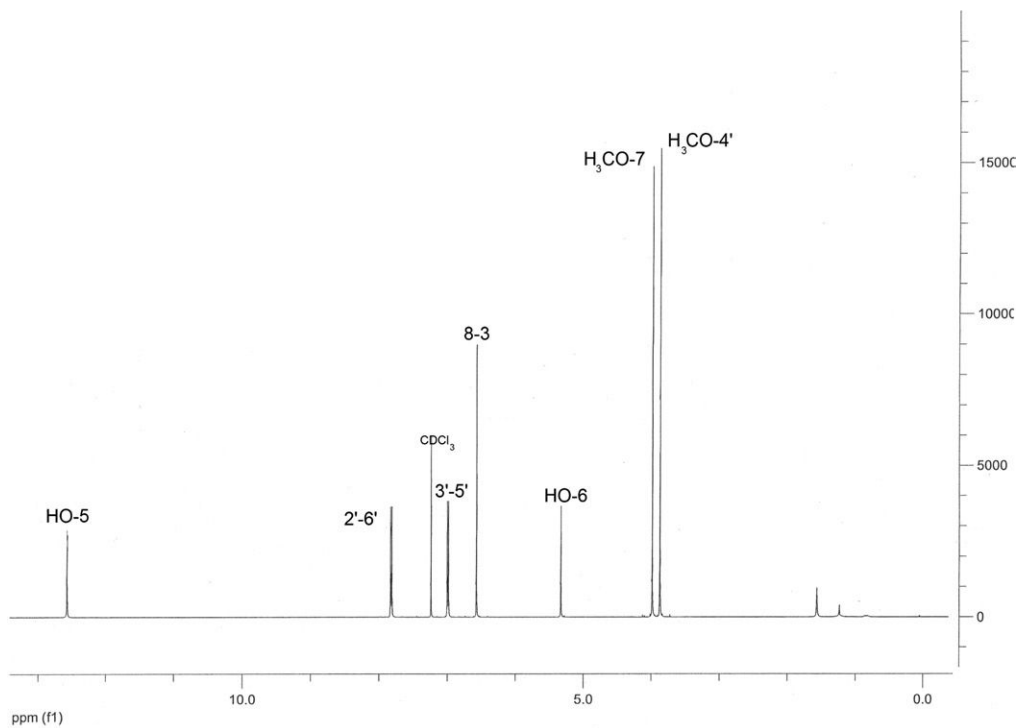
Mice (24 in total) were treated either orally or intravenously with a single dose of 0.25 mg/kg of the inhibitor (solved in saline/10% Cremophor EL; BASF, Ludwigshafen, Germany). At different time points after inhibitor administration (5, 15, 30, 60, 120, or 180 min), 2 mice from each group were killed and the blood was centrifuged to obtain the plasma, which was stored at –80°C until further examination.

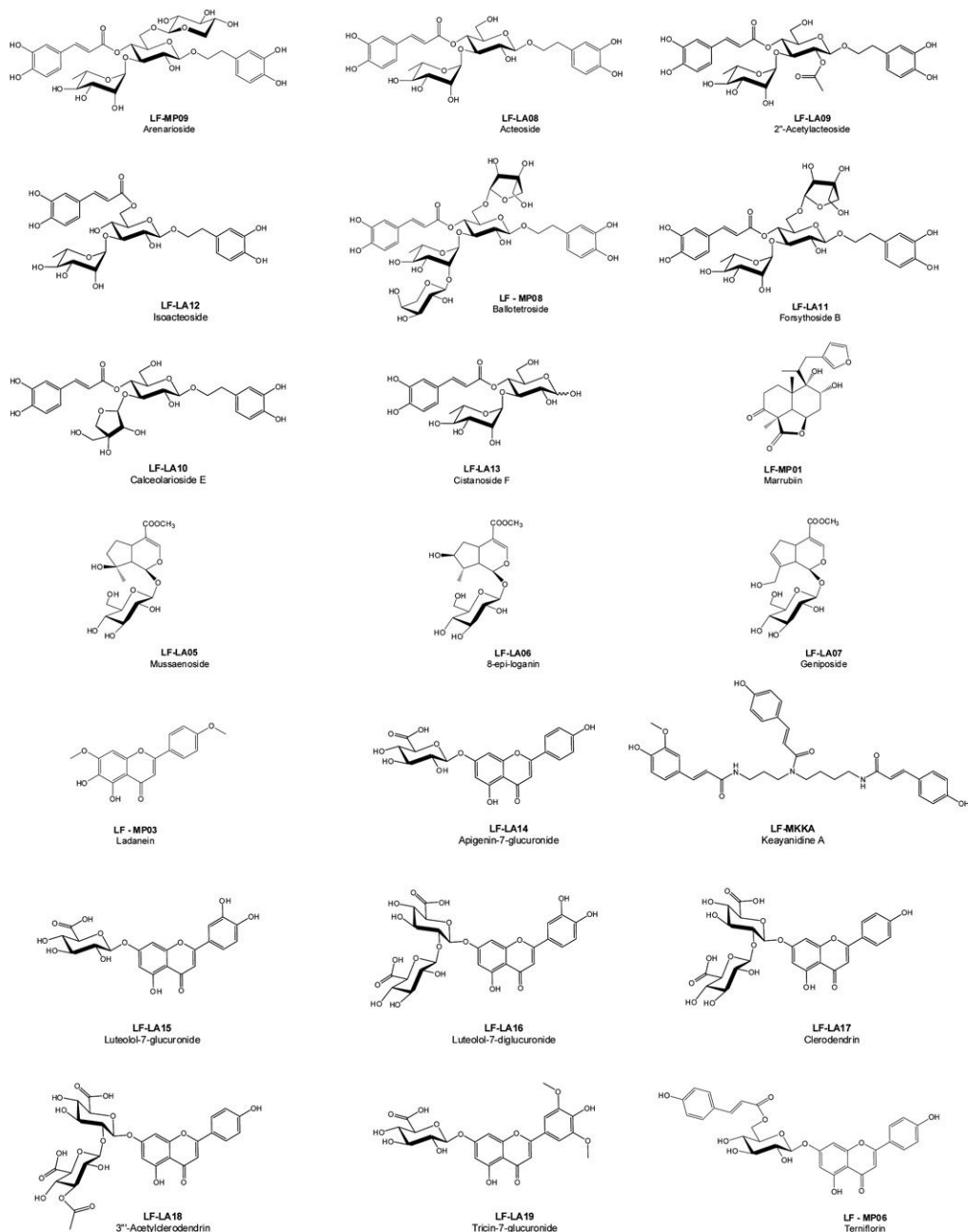
A total of 400 μ L of each plasma sample was mixed with equal amounts of a 2% trifluoroacetic acid and loaded on a SPE Strata C18 column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) (equilibrated with 1 mL methanol and 1 mL 1% trifluoroacetic acid) for solid-phase extraction of the plasma. After several washing steps (1% trifluoroacetic acid and water), the samples were eluted with acetonitrile and dried. The remaining sample was resolved in 25 μ L acetonitrile:water (ratio, 1:1). Samples were analyzed further with liquid chromatography tandem mass-spectrometry (triple quadrupole mass spectrometer LCMS 8030; Shimadzu, Duisburg, Germany), which was calibrated on the day of measurement. Plasma drug concentrations vs time curves were plotted for each route. Bioavailability was calculated by dividing the area

under curve for the oral route by the area under curve for the intravenous route.

References

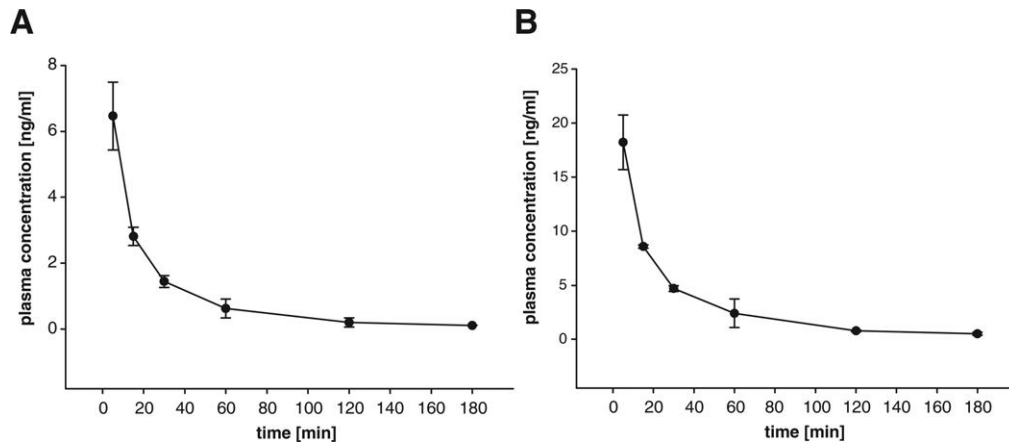
1. Alkhatib R, Joha S, Cheok M, et al. Activity of Iadanein on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare*. *Planta Medica* 2010;76:86–87.
2. Hennebelle T, Sahpaz S, Skaltsounis AL, et al. Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Biochem Syst Ecol* 2007;35:624–626.
3. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006;80:5308–5320.
4. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7408–7413.
5. Reiss S, Rebhan I, Backes P, et al. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 2011;9:32–45.
6. Scheel TK, Gottwein JM, Jensen TB, et al. Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:997–1002.
7. Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, et al. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8738–8743.
8. Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, et al. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* 2009;49:364–377.
9. Yanagi M, St Claire M, Shapiro M, et al. Transcripts of a chimeric cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1b are infectious in vivo. *Virology* 1998;244:161–172.
10. Gottwein JM, Scheel TK, Hoegh AM, et al. Robust hepatitis C genotype 3a cell culture releasing adapted intergenotypic 3a/2a (S52/JFH1) viruses. *Gastroenterology* 2007;133:1614–1626.
11. Jensen TB, Gottwein JM, Scheel TK, et al. Highly efficient JFH1-based cell-culture system for hepatitis C virus genotype 5a: failure of homologous neutralizing-antibody treatment to control infection. *J Infect Dis* 2008;198:1756–1765.
12. Geuenich S, Goffinet C, Venzke S, et al. Aqueous extracts from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti-HIV-1 activity by increasing the virion density. *Retrovirology* 2008;5:27.
13. Hoffmann M, Wu YJ, Gerber M, et al. Fusion-active glycoprotein G mediates the cytotoxicity of vesicular stomatitis virus M mutants lacking host shut-off activity. *J Gen Virol* 2010;91:2782–2793.
14. Spearman C. The method of “right and wrong cases” (“constant stimuli”) without Gauss’s formulae. *Br J Psychol* 1908;2:227–242.
15. Kärber G. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Archiv Exp Pathol Pharmacol* 1931;162:480–487.



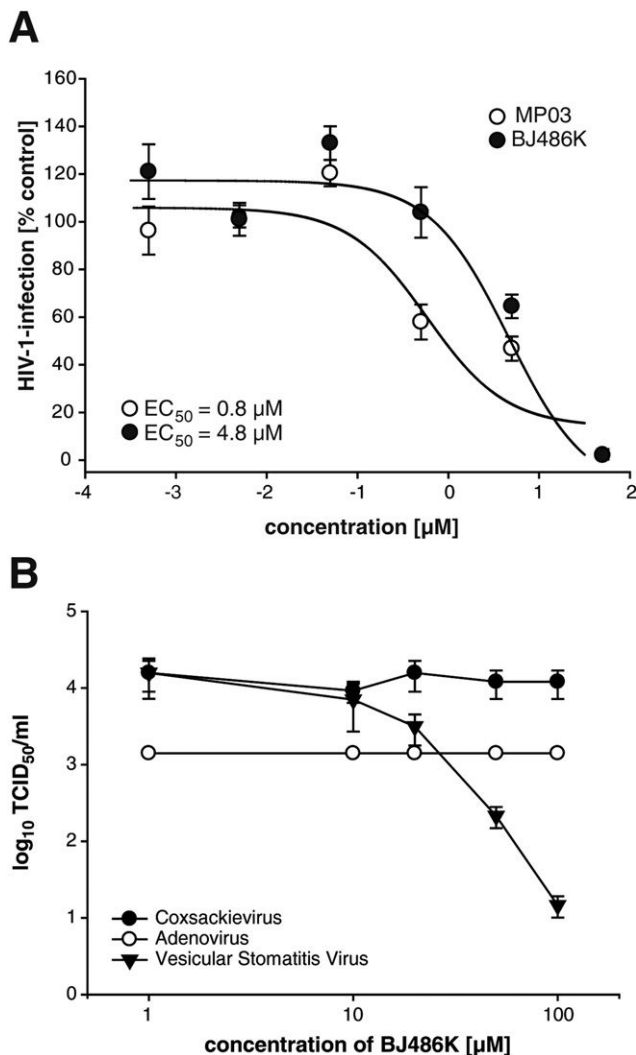


Supplementary Figure 2. Structures of polyphenolic compounds analyzed in this work. All compounds depicted were screened for antiviral activity against HCV using the screening system described in Figure 1. The short name of the extract containing the respective compound as dominant species is given along with the chemical name of the compound.

Supplementary Figure 1. ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic data and elemental analysis detailing the characterization of the synthetic ladanein BJ486K. The exact structure of BJ486K was determined according to the NMR spectroscopy. ^1H (top) and ^{13}C (bottom) NMR spectra were recorded at room temperature on a Bruker Avance 300 spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) (^1H at 300 MHz and ^{13}C at 75 MHz). Chemical shifts are referenced to the solvent signal (^1H NMR, δ 7.26 ppm; ^{13}C NMR, δ 77.0 ppm). The chemical analysis was in agreement with that of the natural ladanein.² Characteristic resonance signals and proton and carbon assignments of the synthetic BJ486K are shown in both spectra, as well as the values of the NMR chemical shifts and data of the elemental analysis.



Supplementary Figure 3. Oral bioavailability of BJ486K in mice. A single dose of 0.25 mg/kg of BJ486K was administered (A) orally or (B) intravenously. Plasma levels of BJ486K were determined 5, 15, 30, 60, 120, and 180 minutes after administration. Mean values of 2 animals including the standard errors are given.



Supplementary Figure 4. Differential antiviral effect of BJ486K on selected enveloped and nonenveloped viruses. (A) Influence of BJ486K and MP03 on HIV was determined as described in the Materials and Methods section. (B) The influence of BJ486K on enveloped vesicular stomatitis viruses and nonenveloped group B coxsackievirus (CoxV) and adenovirus type 5 (AdV5) was determined using limiting dilution assays.

Supplementary Table 1. Antiviral Activity of BJ486K Across All Major HCV Genotypes

HCV isolate	EC ₅₀ [µM]	EC ₉₀ [µM]
H77 (GT1a)	2.46	11.64
Con1 (GT1b)	2.35	9.29
J8 (GT2b)	4.14	8.42
S52 (GT3a)	2.89	10.65
ED43 (GT4a)	0.74	1.78
SA13 (GT5a)	1.39	5.33
HK6a (GT6a)	0.75	2.39

IDENTIFICATION OF A NEW 4-AMINOQUINOLINE DERIVATIVE AS AN INHIBITOR OF HEPATITIS C VIRUS

Thibaut Vausselin¹, Matthieu Lemasson², Muriel Lavie¹, Karin Séron¹, Sandrine Belouzard¹,
Lucie Fénéant¹, Adeline Danneels¹, Laurence Cocquerel¹, Arielle Rosenberg², Patricia
Melnyk^{3#}, Jean Dubuisson^{1#}

¹Institut Pasteur de Lille, Center for Infection & Immunity of Lille (CIIL), F-59019 Lille,
France; CNRS UMR8204, F-59021 Lille, France; Inserm U1019, F-59019 Lille, France;
Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France.

²Laboratoire de Virologie de l'Hépatite C EA4474, Université Paris Descartes, 75014 Paris,
France.

³Université Lille Nord de France, UDSL, EA 4481, UFR Pharmacie, F-59006 Lille, France.

Running title: Anti-HCV activity of a 4-aminoquinoline derivative

Corresponding authors:

-Dr Jean Dubuisson, *Molecular & Cellular Virology of Hepatitis C, CIIL, Inserm (U1019) &
CNRS (UMR8204), Institut Pasteur de Lille, Bâtiment IBL, 1 rue Calmette, BP447, 59021 Lille
cedex, France. Fax: (+33) 3 20 87 12 01; E-mail: jean.dubuisson@ibl.fr*

-Prof Patricia Melnyk, *Université Lille Nord de France, UDSL, EA 4481, UFR Pharmacie, F-
59006 Lille, France; E-mail: patricia.melnyk@univ-lille2.fr*

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection remains a global epidemic. At least 160 million individuals suffer from chronic hepatitis C, with increased risk at developing severe and if untreated fatal liver disease. This positive stranded RNA virus has a high propensity for establishing a chronic infection. Recent improvements in the standard-of-care therapy, now a combination of pegylated interferon alpha (IFN- α), ribavirin and one of two drugs interfering with the virally encoded NS3/4A protease, have raised the hope that HCV infection can be managed efficiently in countries with adequate medical infrastructure [1]. However, the current treatment is not equally effective for all HCV genotypes and significant side effects are still observed. For a number of reasons, an interferon-free regimen would be advantageous for the treatment of chronic hepatitis C. Considerable progress has been made in this regard with the use of various combinations of direct-acting antiviral agents with or without ribavirin [2]. Despite recent progress in HCV treatments, better therapies are still needed to tackle differential sensitivity of isolates or genotypes and the emergence of resistant HCV variants, as well as severe side effects and suboptimal response rates in cirrhotic patients.

HCV is a small enveloped virus with a positive stranded RNA genome belonging to the Hepacivirus genus in the *Flaviviridae* family [3]. Its genome encodes two envelope glycoproteins, E1 and E2, which play a key role in virus entry into the hepatocyte. HCV entry is currently viewed as a complex multistep process since a series of specific cellular entry factors have been shown to be essential in the early steps of the HCV life cycle [4]. After its interaction with entry factors at the cell surface, HCV particle is internalized by clathrin-mediated endocytosis [5]. Importantly, as for several other viruses, HCV can also spread by direct cell-to-cell transfer [6, 7].

Recently, we identified Ferroquine (FQ), a ferrocenic analogue of chloroquine (CQ)[8] as a new inhibitor of HCV entry. Furthermore, CQ has also been shown to inhibit several steps of the HCV life cycle [5, 9, 10]. We were therefore interested to test other derivatives of 4-aminoquinolines for their anti-HCV activity. Here, we tested a series of compounds from three different families of 4-aminoquinolines, and we observed an anti-HCV activity for several of them. Based on its current development for another medical condition, we selected one of them (PPM-B2006) for further characterization of its anti-HCV activity. Our data show that PPM-B2006 inhibits HCV infection at an EC₅₀ close to 1 μ M by blocking several steps of the HCV life cycle.

Materials and method

Chemicals. CQ and amodiaquine compounds were synthesized as previously described. CQ, IFN- α , Heparin and quinidine were purchased from Sigma-Aldrich. PPM-B2006 was prepared as 1 mM stock solutions in phosphate buffered saline (PBS). CQ was prepared as 1 mM stock solutions in water. Boceprevir was kindly provided by Philippe Halfon (Hôpital Ambroise Paré, Marseille, France).

Cell culture. Huh-7 cells [11], HEK-293T cells (ATCC CRL-11268) and RFP-NLS-IPS-Huh7 cells [12] were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum (FCS). Primary human hepatocytes were cultured as previously described [13]. Drug toxicity on Huh-7 cells and primary hepatocytes was evaluated using the MTS assay and the non-radioactive Cytotox 96 assay, respectively, following the recommendations of the manufacturer (Promega).

Antibodies. Monoclonal antibodies (Mabs) anti-HCV E1 glycoprotein (A4) [14], anti-HCV E2 glycoprotein (3/11; kindly provided by J. McKeating, University of Birmingham, UK)[15], anti-NS5A antibody (Austral Biologicals) and anti-CD81 Mab JS-81 CD81 (BD PharmingenTM) were used in this study. Cy3-, Alexa488- and PE-conjugated secondary antibodies were from Jakson ImmunoResearch, Invitrogen and BD PharmingenTM, respectively.

Viruses. To produce cell cultured HCV (HCVcc), we used a modified version of the plasmid encoding JFH1 genome (genotype 2a; GenBank access number AB237837), kindly provided by T. Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan)[16]. Briefly, HCVcc was produced in Huh-7 cells electroporated with *in vitro* transcribed RNA of JFH1 containing (JFH1-Luc) or not the Renilla luciferase reporter gene and engineered to express A4 epitope [17] and titer-enhancing mutations [18]. JFH1 stocks were produced by further amplification in Huh-7 cells. In the JFH1-Luc construct, the Renilla luciferase gene is fused with the viral open reading frame in a monocistronic configuration. With this virus, we verified that our luciferase data were in the linear range of the assay. The JFH1- Δ E1E2-Luc plasmid, containing an in-frame deletion in the E1E2 region, and the JFH1-GND-Luc replication-defective mutant have been described previously [17, 19]. The inhibitory effect of the drugs was determined by quantifying infectivity by indirect immunofluorescence with the anti-E1 Mab A4 [14] or by measuring viral titers with the same antibody. For quantitative binding experiments, purified

virus was obtained by precipitation of HCVcc-infected Huh-7 cells supernatants with 8% polyethylene glycol 6000. Pelleted virus was then loaded onto a continuous 10-40% iodixanol gradient. One ml fractions were collected and the most infectious fractions were pooled. The titer of the stock was 5.10^6 focus forming units (ffu)/ml. The intergenotypic HCVcc chimeras GT1b(Con1)/JFH1 kindly provided by R Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany) and GT3a(552)/JFH1, GT4a(ED43)/JFH1, GT5a(SA13)/JFH1, GT6a(HK6a)/JFH1, kindly provided by J Bukh (University of Copenhagen, Denmark) [20-23], were also used in some experiments. HCV pseudotyped retroviral particles (HCVpp) harboring HCV envelope glycoproteins of JFH1 isolate and expressing the Firefly luciferase reporter gene were produced in HEK-293T as previously described [24].

Cell-to-cell inhibition assay. HCV cell-to-cell transmission was measured by co-cultured infected Huh-7.5-RFP-NLS-IPS donor cells with non-infected Huh-7 receiving cells at the ratio of 1 donor/60 receiving cells. 50µg/mL of neutralizing Mab 3/11 was added in the media. Cells were incubated for 48 hours in the presence or absence of 4µM of PPM-B2006. Cells were finally fixed using Paraformaldehyde (PFA) 3% and processed for immunostaining.

Indirect immunofluorescence. Infected cells grown on glass coverslips were processed for immunofluorescent detection of viral proteins as previously described [25]. Nuclei were stained with 1 µg/ml 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Coverslips were observed with a Zeiss Axiophot microscope, and fluorescent signals were collected with a Coolsnap ES camera (Photometrix, Kew, Australia). For quantification of antigen-positive cells, images of randomly picked areas from each coverslip were recorded.

Quantitative binding and virus internalization assays. Virions bound to Huh-7 cells were determined by quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay as described previously [26]. Internalization was measured as described [27].

Combination assays. The antiviral activity of a range of PPM-B2006 concentrations alone or combined to IFN-α or boceprevir was determined by measuring IC₅₀ values. Then, combination index was calculated according to a previously reported method [28]. Prichard and Shipman method [29] was also used to analyze interaction effects, using a 3-D approach. This method presents complete drug interactions.

Graphs and statistics. Prism v5.0c (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) software was used to prepare graphs, to calculate IC₅₀ values and to determine statistical significance of differences between data sets.

Results

PPM-B2006 inhibits HCV infection. We first tested eleven chemical derivatives from 4-aminoquinolines. As shown in Figure 1A, these derivatives belong to three different families: two designed from CQ and one designed from amodiaquine. To test the effect of these derivatives on the HCV life cycle, the compounds were added to Huh-7 target cells before as well as during infection. We identified six different molecules able to inhibit HCV infection (Figure 1B) at doses that did not show any cytotoxic effect (data not shown). We focused on one of the B family compound, named PPM-B2006 (compound B5 in Figure 1B), as its pharmacodynamics properties allow some potential therapeutic use.

To characterize the anti-HCV activity of PPM-B2006, we compared the effect of this compound in two different assays of HCV infection. The first assay measures the effect of the molecule on HCV replication by directly counting the number of cells expressing HCV proteins in the presence of the drug (Figure 1C). The second assay measures the effect of the molecule on the whole HCV life cycle by titrating the virus released from infected Huh-7 cells treated with the compound (Figure 1E). As shown in Figure 1C, PPM-B2006 exhibited a dose-dependent inhibition of the expression of HCV glycoprotein E1, indicating that it specifically affects the HCV life cycle during virus entry and/or genomic replication. Interestingly, the inhibitory effect was slightly more potent in the second assay, suggesting a slight additional effect of the compound on virus assembly and/or release. Indeed, the estimated IC₅₀ was 1.36 μ M (\pm 0.69) in the first assay, whereas it was 0.91 μ M (\pm 0.64) in the second assay. Furthermore, the IC₉₀ was 2.57 μ M (\pm 1.07) in the first assay and 2.27 μ M (\pm 0.46) in the second assay. The inhibitory effect was not due to cytotoxicity since parallel experiments did not show any toxic effect of the drug at the concentrations tested (Figure S1A). PPM-B2006 showed a 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) of 16.32 μ M and a therapeutic index of 18. As shown in Figures 1D and 1F, CQ was less effective against HCV. Indeed, the IC₅₀ and IC₉₀ values for CQ were 2.82 μ M (\pm 1.57) and 3.91 μ M (\pm 1.04), respectively. Furthermore, CQ had a CC₅₀ of 18.75 μ M and a therapeutic index of 6.65. To determine whether other members of the Flaviviridae family are also affected by PPM-B2006, we tested this compound on yellow fever virus, another member

of this viral family. However, PPM-B2006 did not show any inhibitory effect on this virus (data not shown). Altogether, these results indicate that PPM-B2006 has a specific antiviral activity against HCV.

PPM-B2006 affects several steps of the HCV life cycle. To determine at which step PPM-B2006 inhibits HCV, the compound was added or removed at different time points before, during and after inoculation of Huh-7 cells with JFH1 (Figure 2E). As shown in Figures 2A and 2B, the highest decrease in HCV infection was observed when PPM-B2006 was present from the beginning of infection. However, some antiviral effect was still detected when PPM-B2006 was added post-infection. As shown in Figures 2C and D, similar results were obtained with CQ. Parallel control experiments with well-characterized HCV inhibitors are presented in Figure S2 and S3. These results suggest that PPM-B2006 inhibits several steps of the HCV life cycle.

Effect of PPM-B2006 on HCV entry. To investigate the effect of PPM-B2006 on HCV entry, we used the HCVpp system. These are retroviral cores carrying HCV glycoproteins in their envelope. In this context only the early steps of the viral life cycle, i.e. virus interaction with receptors, uptake and fusion, are HCV specific, whereas all later steps are dependent on the retroviral nucleocapsid elements. Using this approach, PPM-B2006 inhibited HCVpp entry in a dose-dependent manner with an EC_{50} of $1.80 \mu\text{M}$ (± 0.78) (Figure 3A). Furthermore, this effect was specific of HCV envelope glycoproteins since PPM-B2006 did not affect the entry of control pseudoparticles containing the envelope glycoprotein of the feline endogenous retrovirus RD114. These data indicate that PPM-B2006 is an inhibitor of HCV entry. We then further investigated the entry step affected by this compound. To determine whether PPM-B2006 impairs directly the binding of particles to the cell surface, we analyzed virus binding in the presence of PPM-B2006. Cells were inoculated with purified HCV virions at 4°C in the presence or absence of PPM-B2006, and the amount of bound virions was determined by quantifying HCV genomic RNA. Heparin was used as a control of inhibition of HCV binding. As expected, heparin strongly reduced HCV attachment to the cell surface (Figure 3B). In contrast, in the presence of PPM-B2006, no effect on virus binding was observed (Figure 3B), indicating that PPM-B2006 does not inhibit HCV entry by impairing virus binding to the cell surface. Therefore, we also analyzed the effect of this molecule on the internalization of the viral particle. As shown in Figure 3B, HCV internalization was not affected by PPM-B2006 treatment, indicating that this molecule blocks a post-internalization step. To further analyze

the mechanism by which PPM-B2006 inhibits HCV entry, we also assessed the surface expression of some known essential HCV entry factors (CD81, SRB1 and CLDN) in the presence of PPM-B2006. However, we did not detect any effect of the compound on these receptors (data not shown). Together, these data indicate that PPM-B2006 affect a late step of HCV entry.

Effect of PPM-B2006 on HCV replication. The above data show that PPM-B2006 has an effect on HCV entry. However, as shown in Figure 2, addition or removal of the drug after virus entry suggest that PPM-B2006 has also some effects on other step(s) of the HCV life cycle, so we further tested the potential post-entry effects of PPM-B2006 on HCV. To analyze the effect of PPM-B2006 on HCV genome replication, Huh-7 cells were electroporated with *in vitro* transcribed assembly-defective JFH1- Δ E1E2-Luc RNA, to bypass the entry step, and avoid any interference with late steps of the HCV life cycle. Furthermore, Boceprevir was used in parallel as a control of inhibition of viral replication (Figure 4B). As shown in Figure 4A, PPM-B2006 also inhibited HCV replication with an EC₅₀ of 2.57 μ M (\pm 1.64). This observation is in agreement with the additional antiviral effect detected when PPM-B2006 was added post-infection (Figure 2B).

PPM-B2006 inhibits HCV infection in primary hepatocytes. Although human hepatocellular carcinoma derived cell lines allow the study of the complete HCV replication cycle, these cells are phenotypically and functionally very different from hepatocytes *in vivo*. Since primary human hepatocytes more closely resemble the hepatocytes that are the main reservoir for HCV within the infected host, we assessed the effects of PPM-B2006 on this cell culture model as previously described [13]. As shown in Figure 5A, PPM-B2006 efficiently inhibited HCV infection of primary hepatocytes with an IC₅₀ of 4.04 μ M (\pm 1.85). Moreover no cytotoxicity was observed in primary human hepatocytes at the concentrations used in our experiments (Figure 5B). These data indicate that PPM-B2006 is able to block HCV infection of its natural target cells.

PPM-B2006 inhibits HCV infection with HCVcc chimeras from other genotypes. To further characterize the inhibition of HCV infection by PPM-B2006, we tested its effect on other genotypes in the context of the HCVcc system, using chimeras. As shown in Table 1, a similar antiviral activity was observed on the other genotypes tested, indicating that PPM-B2006 is not genotype specific.

PPM-B2006 inhibits cell-to-cell transmission. Following infection of Huh-7 cells with HCVcc, progeny viruses are transmitted to adjacent cells resulting in focal areas of spreading infection (foci). This mode of transmission is refractory to neutralization by anti-E2 antibodies [6]. To determine whether PPM-B2006 can block cell-to-cell spread, HCV-infected RFP-NLS-IPS-Huh-7 cells were co-cultured with naïve Huh-7 cells in the presence or absence of PPM-B2006 as described [30]. As shown in Figure 6, a strong decrease in cell-to-cell transmission was clearly observed in the presence of PPM-B2006.

Antiviral effect of PPM-B2006 in combination with IFN- α or Boceprevir. We tested whether PPM-B2006 could be combined with other anti-HCV compounds currently used in hepatitis C treatment. We used Boceprevir, a drug targeting directly the HCV protease NS3/4A, and IFN- α that has been used for several decades in anti-HCV treatment. These drug combinations were analyzed using the Combination Index (CI) and the method of Prichard and Shipman [29]. Each drug was combined with PPM-B2006 at different fractions of their IC₅₀. Combination of PPM-B2006 with Boceprevir and IFN- α resulted in an additive effect as reflected by CI of 0.99 (\pm 0.08) and 0.98 (\pm 0.15), respectively. Furthermore, synergy was also observed for some low concentrations of PPM-B2006 with Boceprevir (Figure 7).

Discussion

Despite recent progress in HCV treatments, better and cheaper therapies are still needed to tackle the emergence of resistant HCV variants, as well as severe side effects and suboptimal response rates in cirrhotic patients. Here, we describe the characterization of PPM-B2006, a new 4-aminoquinoline derivative with a potent anti-HCV activity. Our data show that PPM-B2006 inhibits HCV infection at an EC₅₀ close to 1 μ M by blocking HCV entry and replication. Furthermore, we also showed that this compound is active on different genotypes and is able to inhibit cell-to-cell transmission.

PPM-B2006 is more potent than CQ. CQ is an aminoquinoline known since 1934 that has been developed as an antimalarial drug. Apart from its well-known antimalarial effects, the drug has also interesting antiviral effects [31]. CQ can indeed inhibit the pH-dependent steps of the replication of several viruses, including HCV [5, 9]. CQ is also an inhibitor of autophagy [32] and by this effect, it can also contribute to its anti-HCV activity [10]. Moreover, CQ has immunomodulatory effects, leading to its potential use in some infectious diseases. Indeed, in

HIV infected individuals, CQ was repeatedly reported to be effective in counteracting the deleterious immune activation associated with the disease [33]. However, in clinical trials against influenza virus and chikungunya, CQ was rather disappointing [34, 35]. This could be due high viral loads in vivo, poor penetration in specific tissues and narrow therapeutic indexes. The antiviral of PPM-B2006 shows strong improvements as compared to CQ. PPM-B2006 has indeed a much higher therapeutic index of 18 instead of 6.65 and it is approximately 3 times more potent than CQ in our experimental conditions. Furthermore, the demonstration that PPM-B2006 can also inhibit HCV infection in primary hepatocytes indicates that this compound remains effective in more physiological conditions.

PPM-B2006 is as potent as FQ. Recently, we reported that FQ, a ferrocenic analogue of CQ [8] is a promising inhibitor of HCV. This bioorganometallic compound is currently one of the most promising new candidate drugs in the antimalarial pipeline, and it is about to complete phase II clinical trials as a treatment for uncomplicated malaria [36]. With an EC₅₀ of 0.91 μ M (this work) and 0.80 μ M [8] for PPM-B2006 and FQ, respectively, these two compounds show similar potency. However, FQ has a therapeutic index of 6.7, whereas PPM-B2006 has a therapeutic index of 18, indicating that PPM-B2006 has a wider therapeutic window for the potential treatment of HCV.

PPM-B2006 inhibits a late step in HCV entry. CQ is also an inhibitor of HCV entry [5, 9], and its mechanism of action involves impaired endosomal-mediated virus entry, most likely through the prevention of endocytosis and/or endosomal acidification. Due to structural similarities, it is likely that PPM-B2006 inhibits HCV entry by a similar mechanism. The effect of PPM-B2006 on a post-internalization step of HCV entry is indeed in favor of mechanism involving impaired endosomal-mediated virus entry. It is worth noting that FQ also affects a post-internalization step of HCV entry [8]. However, its mechanism of action is potentially different [37], and it could be linked to its capacity to generate reactive oxygen species and induce lipid peroxidation [38, 39]. Further studies will therefore be needed to define more precisely the mechanism by which PPM-B2006 inhibits HCV entry.

In addition to its effect on HCV entry, PPM-B2006 can also affect HCV RNA replication, albeit at slightly higher concentrations. This inhibitory effect is similar to the inhibition of an HCV subgenomic replicon by CQ [10]. HCV is known to exploit autophagy for its replication [40], and inhibition of replication by CQ targets virus-associated autophagy [10]. However, it remains to be determined whether inhibition of HCV RNA replication by PPM-B2006 depends on the same mechanism.

Acknowledgments

This work was supported by the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS). T.V. and M.L. were supported by a fellowship from the ANRS. S.B. was supported by a Marie Curie International Reintegration Grant (PIRG-GA-2009-256300).

We are also grateful to R. Bartenschlager, J Bukh, F.L. Cosset, P. Halfon, J. McKeating and T. Wakita for providing essential reagents. The immunofluorescence analyses were performed with the help of the imaging core facility of the BioImaging Center Lille Nord-de-France.

References

1. Asselah T, Marcellin P. New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. *Liver Int* **2011**; 31 Suppl 1:68-77.
2. Liang TJ, Ghany MG. Current and future therapies for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **2013**; 368:1907-17.
3. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, **2007**:1101-52.
4. Belouzard S, Cocquerel L, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry into the hepatocyte. *Cent Eur J Biol* **2011**; 6:933-45.
5. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **2006**; 80:6964-72.
6. Timpe JM, Stamataki Z, Jennings A, et al. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* **2008**; 47:17-24.
7. Witteveldt J, Evans MJ, Bitzegeio J, et al. CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol* **2009**; 90:48-58.
8. Vausselin T, Calland N, Belouzard S, et al. The antimalarial ferroquine is an inhibitor of hepatitis C virus. *Hepatology* **2013**; 58:86-97.
9. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. Lysosomotropic agents as HCV entry inhibitors. *Virol J* **2011**; 8:163.
10. Mizui T, Yamashina S, Tanida I, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol* **2010**; 45:195-203.
11. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **1982**; 42:3858-63.

12. Wahid A, Helle F, Descamps V, Duverlie G, Penin F, Dubuisson J. Disulfide bonds in hepatitis C virus glycoprotein E1 control the assembly and entry functions of E2 glycoprotein. *J Virol* **2013**; 87:1605-17.
13. Podevin P, Carpentier A, Pene V, et al. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* **2010**; 139:1355-64.
14. Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* **1994**; 68:6147-60.
15. Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD, et al. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* **1999**; 73:6235-44.
16. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **2005**; 11:791-6.
17. Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, et al. Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **2010**; 84:773-87.
18. Delgrange D, Pillez A, Castelain S, et al. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* **2007**; 88:2495-503.
19. Rocha-Perugini V, Montpellier C, Delgrange D, et al. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* **2008**; 3:e1866.
20. Gottwein JM, Scheel TK, Hoegh AM, et al. Robust hepatitis C genotype 3a cell culture releasing adapted intergenotypic 3a/2a (S52/JFH1) viruses. *Gastroenterology* **2007**; 133:1614-26.
21. Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, et al. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* **2009**; 49:364-77.
22. Jensen TB, Gottwein JM, Scheel TK, Hoegh AM, Eugen-Olsen J, Bukh J. Highly efficient JFH1-based cell-culture system for hepatitis C virus genotype 5a: failure of homologous neutralizing-antibody treatment to control infection. *J Infect Dis* **2008**; 198:1756-65.
23. Scheel TK, Gottwein JM, Jensen TB, et al. Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105:997-1002.
24. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C pseudo-particles containing functional E1E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **2003**; 197:633-42.
25. Rouille Y, Helle F, Delgrange D, et al. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol* **2006**; 80:2832-41.

26. Castelain S, Descamps V, Thibault V, et al. TaqMan amplification system with an internal positive control for HCV RNA quantitation. *J Clin Virol* **2004**; 31:227-34.
27. Albecka A, Belouzard S, de Beeck AO, et al. Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* **2012**; 55:998-1007.
28. Zhao L, Wientjes MG, Au JL. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clin Cancer Res* **2004**; 10:7994-8004.
29. Prichard MN, Shipman C, Jr. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. *Antiviral Res* **1990**; 14:181-205.
30. Meuleman P, Albecka A, Belouzard S, et al. Griffithsin has antiviral activity against hepatitis C virus. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55:5159-67.
31. Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect Dis* **2003**; 3:722-7.
32. Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology* **2011**; 8:528-39.
33. Savarino A. Use of chloroquine in viral diseases. *Lancet Infect Dis* **2011**; 11:653-4.
34. Paton NI, Lee L, Xu Y, et al. Chloroquine for influenza prevention: a randomised, double-blind, placebo controlled trial. *Lancet Infect Dis* **2011**; 11:677-83.
35. Kaur P, Chu JJ. Chikungunya virus: an update on antiviral development and challenges. *Drug discovery today* **2013**.
36. Biot C, Nosten F, Fraisse L, Ter-Minassian D, Khalife J, Dive D. The antimalarial ferroquine: from bench to clinic. *Parasite* **2011**; 18:207-14.
37. Dubar F, Bohic S, Slomianny C, et al. In situ nanochemical imaging of label-free drugs: a case study of antimalarials in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Chem Commun (Camb)* **2012**; 48:910-2.
38. Chavain N, Vezin H, Dive D, et al. Investigation of the redox behavior of ferroquine, a new antimalarial. *Mol Pharm* **2008**; 5:710-6.
39. Dubar F, Egan TJ, Pradines B, et al. The antimalarial ferroquine: role of the metal and intramolecular hydrogen bond in activity and resistance. *ACS Chem Biol* **2011**; 6:275-87.
40. Dreux M, Chisari FV. Impact of the autophagy machinery on hepatitis C virus infection. *Viruses* **2011**; 3:1342-57.

A.

DONNÉES
CONFIDENTIELLES

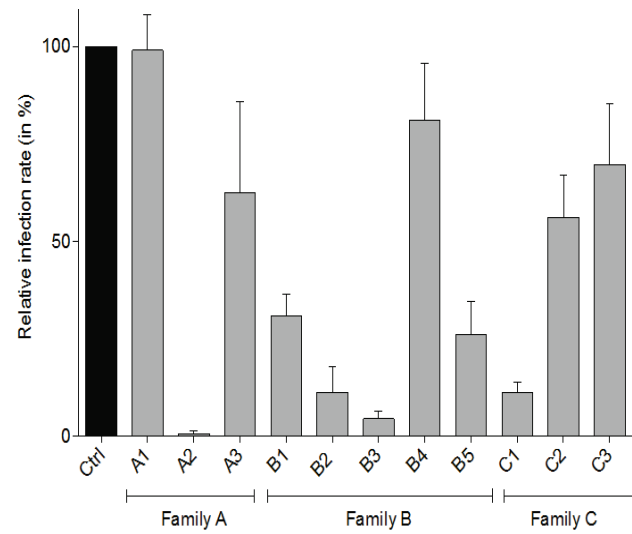
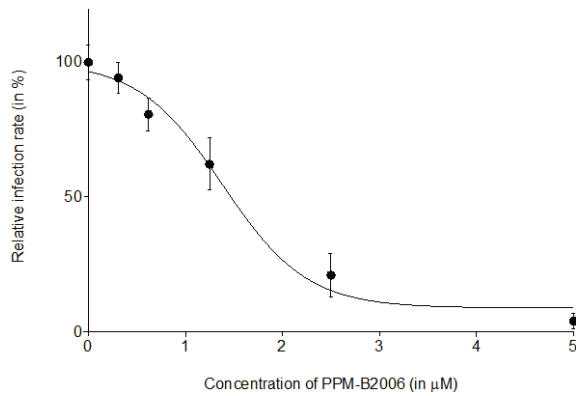
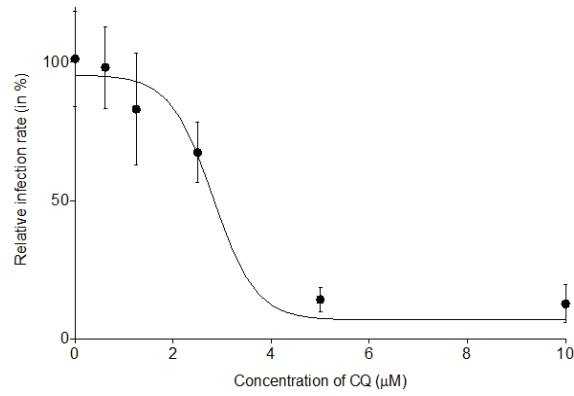
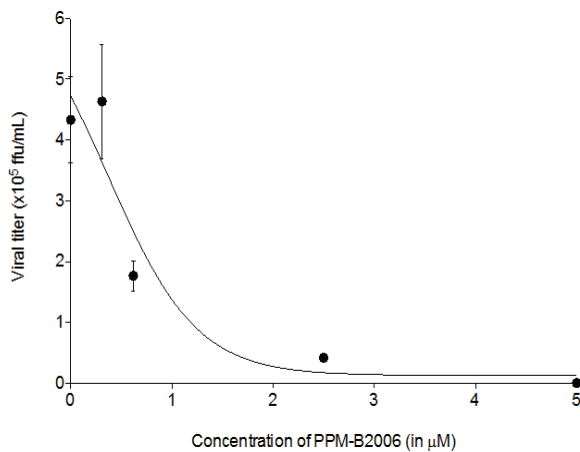
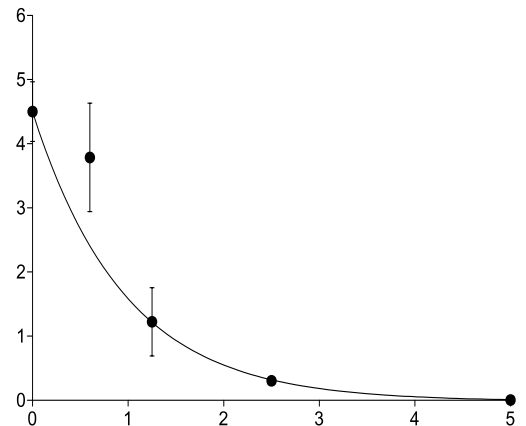
B.**C.****D.****E.****F.**

Figure 1: PPM-B2006 inhibits HCV infection. (A) Presentation of the chemical structures of the families of compounds tested. (B) Anti-HCV activity of the compounds tested at a non-cytotoxic concentration. Anti-HCV activity of PPM-B2006 (C and E) and CQ (D and F). Huh-7 cells were pretreated for 1 h with PPM-B2006 (C and E) or CQ (D and F) before infection with JFH1 (MOI of 1), and infected cells were in contact with the drugs until the end of the experiment. At 48 h post-infection, infected cells were quantified by indirect immunofluorescence (B, C and D), and virus released in the supernatant was titrated (E and F). For the infected cells, results are expressed as percentage of infection as compared to the control infection in the presence of the solvent. It is worth noting that the final concentration of solvent was adjusted to be the same for all the PPM-B2006 concentrations. Error bars indicate standard errors of the mean values (C and D) or standard deviations (E and F) from at least two independent experiments.

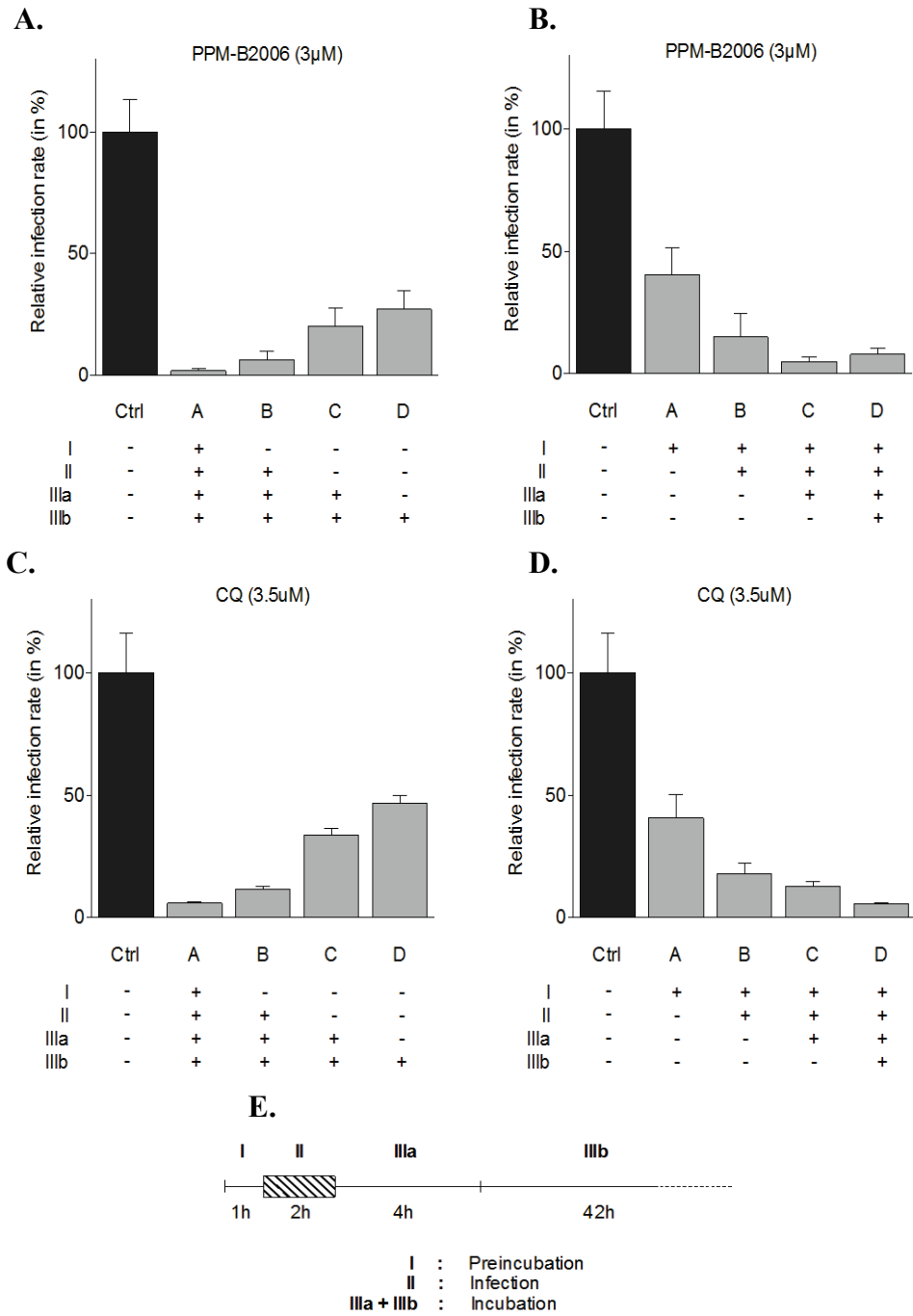


Figure 2: PPM-B2006 inhibits several steps of the HCV life cycle. Huh-7 cells were infected with JFH1 (MOI of 1) and treated for different periods of time with PPM-B2006 (A and B) or CQ (C and D) as indicated in panel E. At 48 h post-infection, infected cells were quantified. Results are expressed as percentage of infection relative to the control post infection in the presence of solvent (Ctrl). Error bars indicate standard errors of the mean values from at least three experiments. The absence of cell toxicity was controlled in parallel experiments (data not shown).

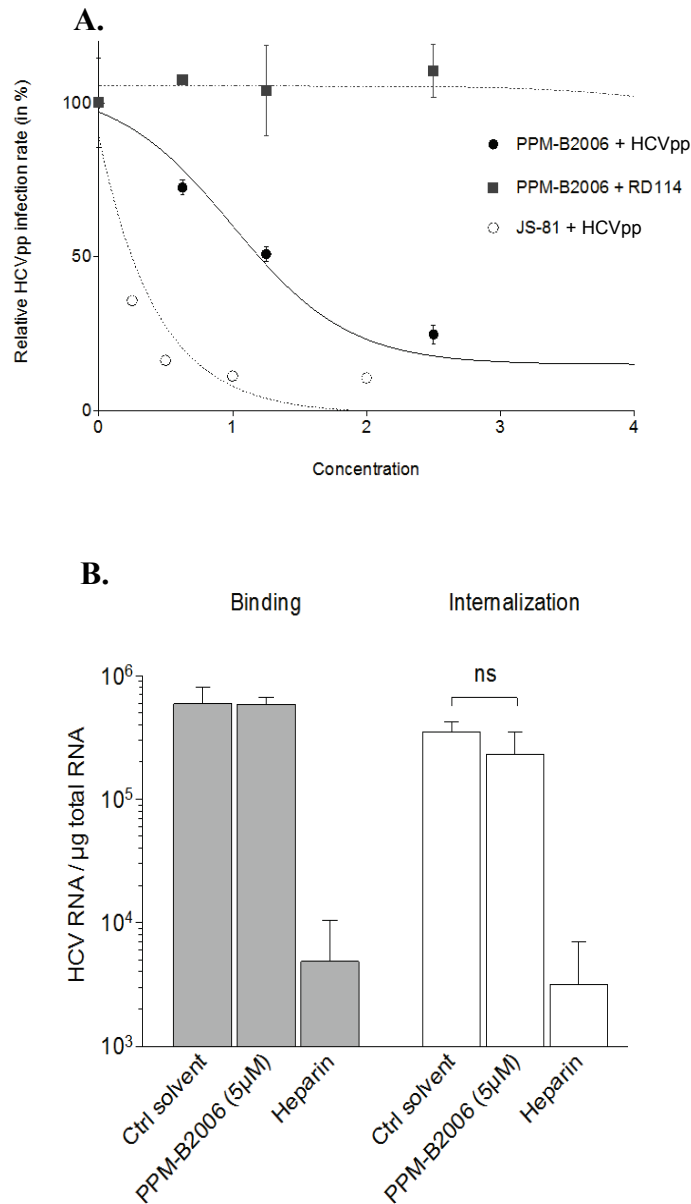


Figure 3: PPM-B2006 inhibits a late step of HCV entry. PPM-B2006 inhibits HCVpps (A). Huh-7 cells were infected with HCVpp or pseudoparticles containing the envelope glycoprotein of the feline endogenous retrovirus RD114. Cells were treated for 1 h before infection and for the whole duration of infection. At 48 h post-infection, cells were lysed to quantify the luciferase activity. A control experiment with anti-CD81 Mab JS-81 was performed in parallel. HCVpp infectivity varied between 10^5 and 10^6 relative light units (RLU). Results are expressed as percentage of infection as compared to the control infection in the presence of solvent. Error bars indicate standard errors of the mean values from at least two independent experiments. Effect of PPM-B2006 on HCV binding and internalization (B). Huh-7 cells were inoculated for 1 h at 4°C with purified HCVcc at a MOI of 10 in the presence of solvent (PBS), PPM-B2006 or 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of heparin. Cells were washed thrice with ice-cold PBS and total RNA was extracted. For internalization, the binding step was followed by 30 min incubation at 37°C , cells were then chilled on ice and non-internalized virions were removed by trypsinization for 1 h at 4°C . Bound HCV virions or internalized viral particles were detected by quantification of HCV genomic RNA by qRT-PCR. Mean values \pm SD (error bars) of three different experiments are presented. Turkey's Multiple Comparison Test was used for statistical analysis. To verify the efficacy of trypsin treatment, virus was bound to cells at 4°C and then removed by trypsinization (data not shown). No significant (ns) difference was observed between treated and untreated cells.

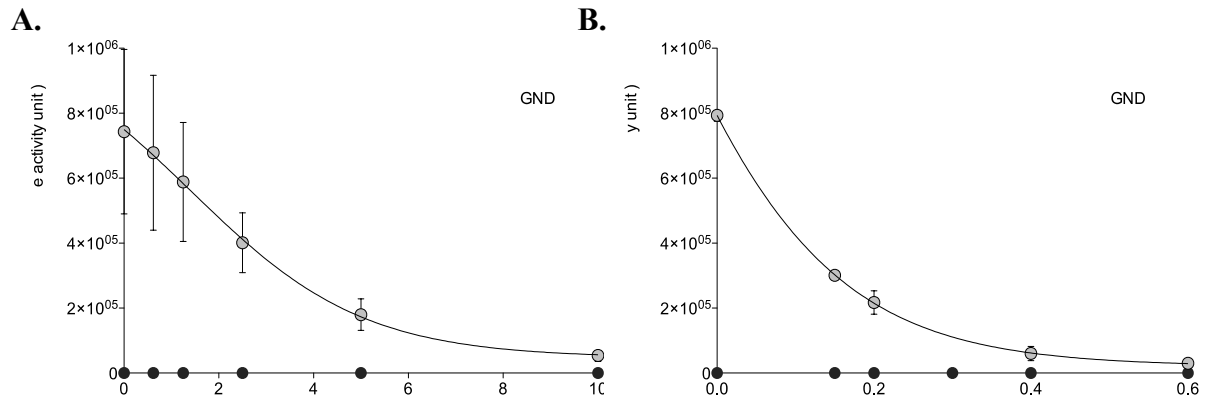


Figure 4: Effect of PPM-B2006 on HCV replication. JFH1- Δ E1E2-Luc RNA was electroporated in Huh-7 cells and, at 4 h post-electroporation, cells were treated or not with PPM-B2006 (A) or Boceprevir (BCP) (B). Cells were lysed 48 h later. Results are expressed as percentage of replication in the absence of drug. The specificity of replication was confirmed with a JFH1-GND-Luc (GND) replication defective mutant.

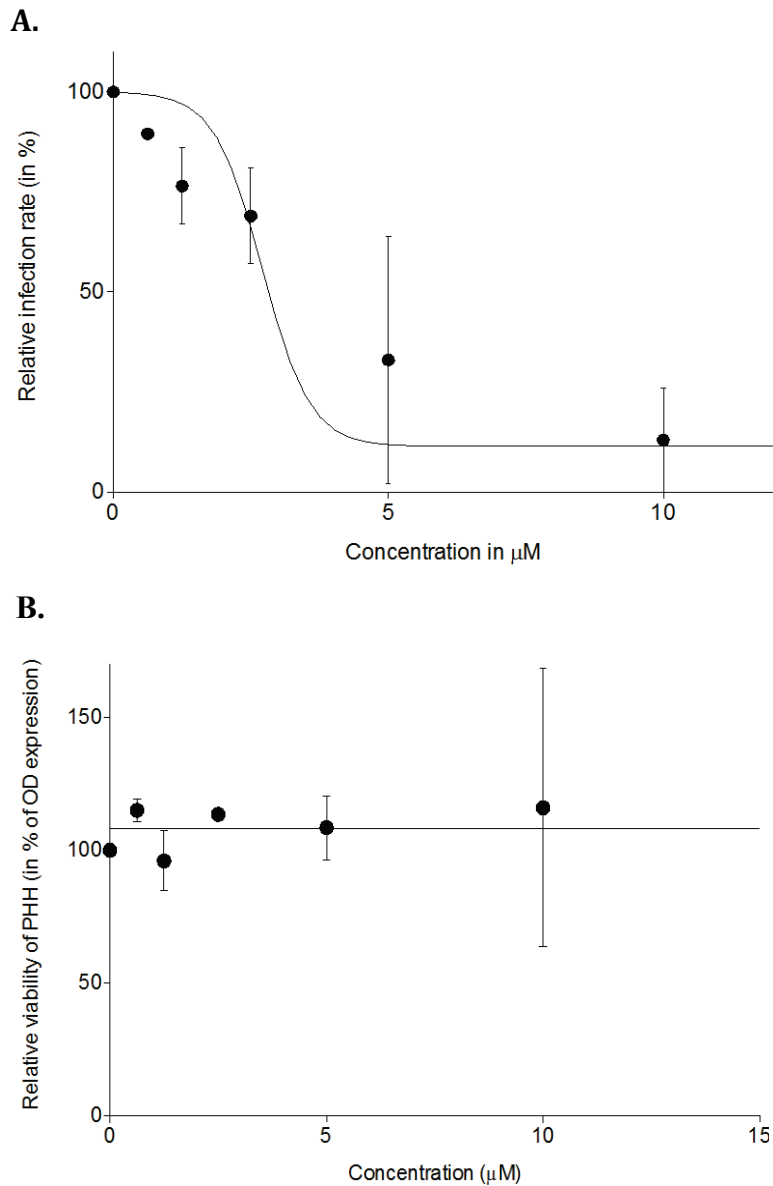


Figure 5: PPM-B2006 inhibits HCV infection in primary hepatocytes. (A) Dose-dependent decrease of infectious virus titers released from freshly isolated primary human hepatocytes infected with JFH1 viral stock and treated with increasing amounts of PPM-B2006 or solvent for 3 days. Shown are infectivity titers (in ffu) expressed as percentage of solvent control. Mean values \pm SD (error bars) of two different experiments are presented. (B) Toxicity of PPM-B2006 on primary hepatocytes. Cells were cultured in the presence of different concentrations of PPM-B2006 and their viability was monitored using MTS based viability assay after 48 h by determining optical density (OD) at 490 nm. Results are means \pm SD (error bars from at least two experiments).

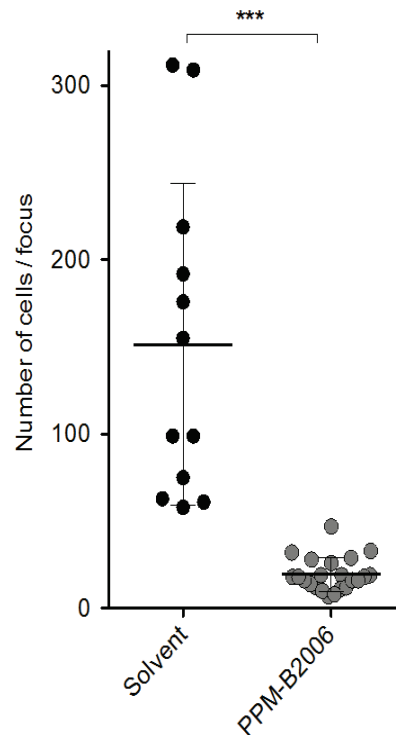
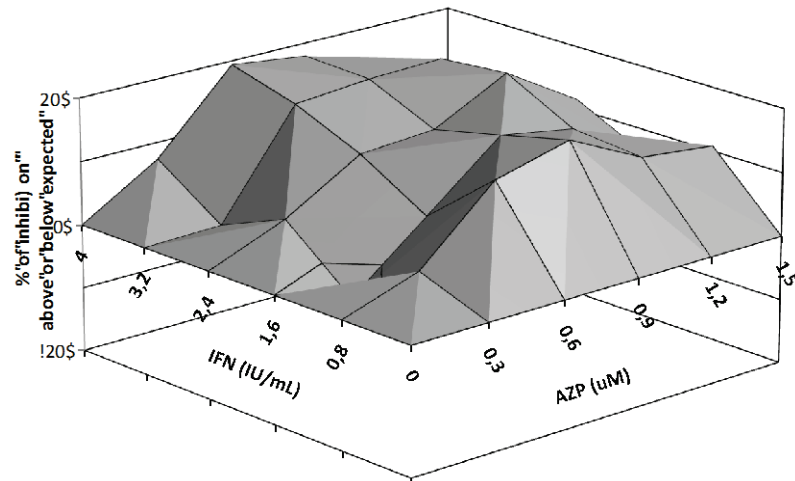


Figure 6: PPM-B2006 inhibits cell-to-cell transmission. Co-cultures of naïve Huh-7 target cells with JFH1-infected RFP-NLS-IPS-Huh-7 cells were treated with neutralizing Mab 3/11 (50 µg/ml) in the presence of PPM-B2006 or its solvent (as control). The numbers of infected target cells were measured by immunofluorescence in at least 22 foci for each condition. The bars indicate the mean values with standard deviation. *** $p < 0.001$.

A.



B.

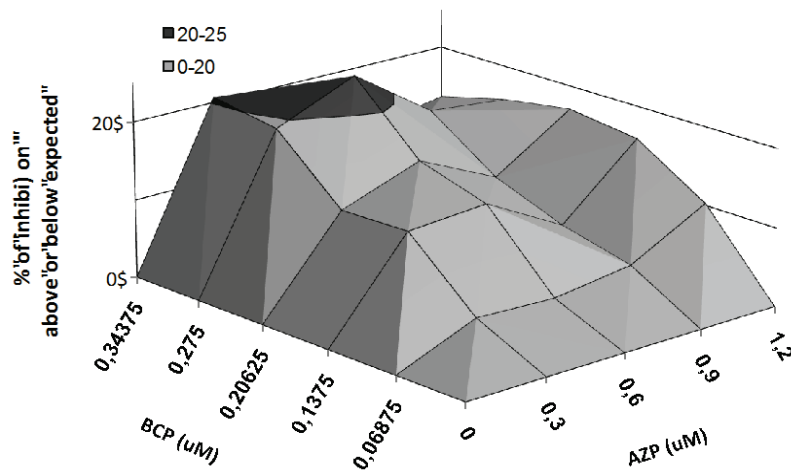


Figure 7: 3D-analysis of the in vitro interaction between PPM-B2006 and Boceprevir (BCP) or IFN- α . Combinations on JFH1 infection were evaluated using the method of Prichard and Shipman (34). Combination studies for each pair of compounds were performed in triplicate. The theoretical additive effect is calculated from the dose response curves of individual compounds by the equation $Z=X+Y(1-X)$ where X and Y represent the inhibition produced by the individual compounds and Z represents the effect produced by the combination of compounds. The theoretical additive surface is subtracted from the actual experimental surface, resulting in a horizontal surface that equals the zero plane when the combination is additive. A surface raising more than 20% above the zero plane indicates a synergistic effect of the combination and a surface dropping lower than 20% below the zero plane indicates antagonism.

Genotypes	IC₅₀ (μM)
gt2a	0.91
gt3a	2.05
gt4a	1.47
gt5a	0.77
gt6a	2.57

Table 1: PPM-B2006 inhibits other HCV genotypes. The antiviral effect of PPM-B2006 was tested on chimeric viruses expressing the structural proteins of different genotypes. IC_{50s} were determined base on the titration of virus released in the supernatant of treated cells.

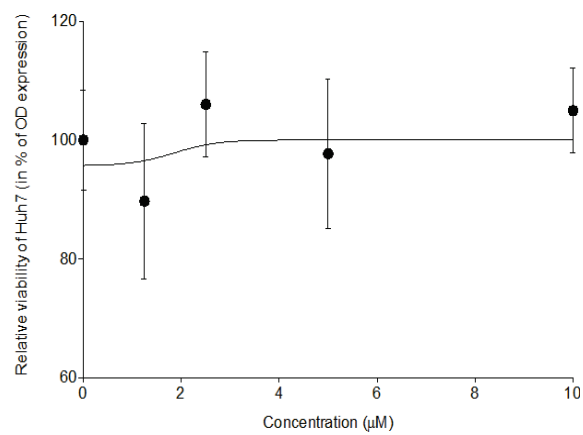


Figure S1: Toxicity of PPM-B2006 on Huh7 cells. Huh-7 cells were cultured in the presence of different concentrations of PPM-B2006 and their viability was monitored using MTS based viability assay after 48 h by determining optical density (OD) at 490 nm. Results are means \pm SD (error bars from at least three experiments).

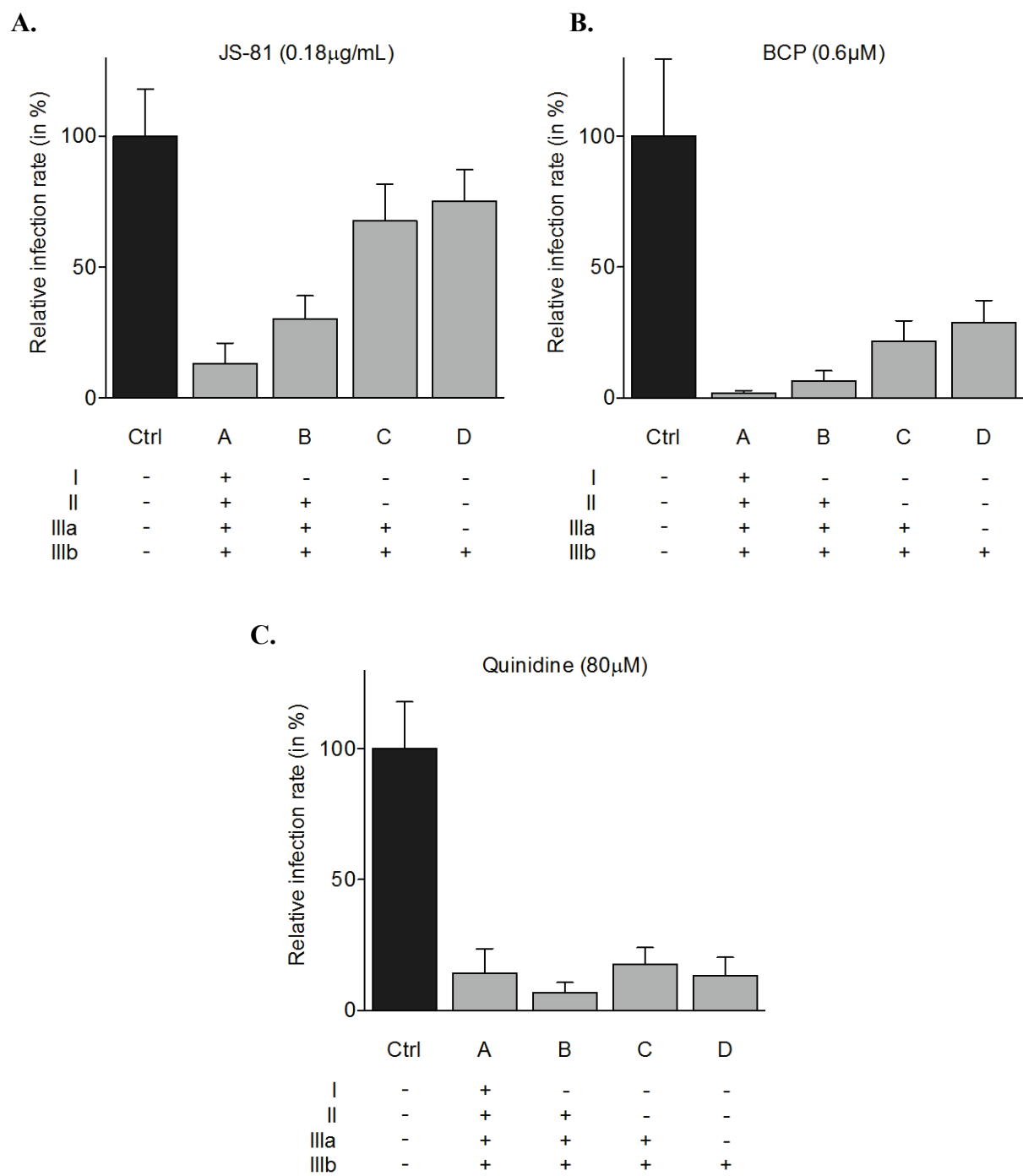


Figure S2: HCV inhibition with characterized HCV inhibitors added during infection or at different period post-infection. Huh-7 cells were infected with JFH1 and treated with Mab JS-81, Boceprevir or Quinidine added during infection or at different times post-infection as indicated Figure 2E. At 48 h post-infection, infected cells were quantified by indirect immunofluorescence. Results are expressed as percentage of infection compared to the control infection in the presence of solvent

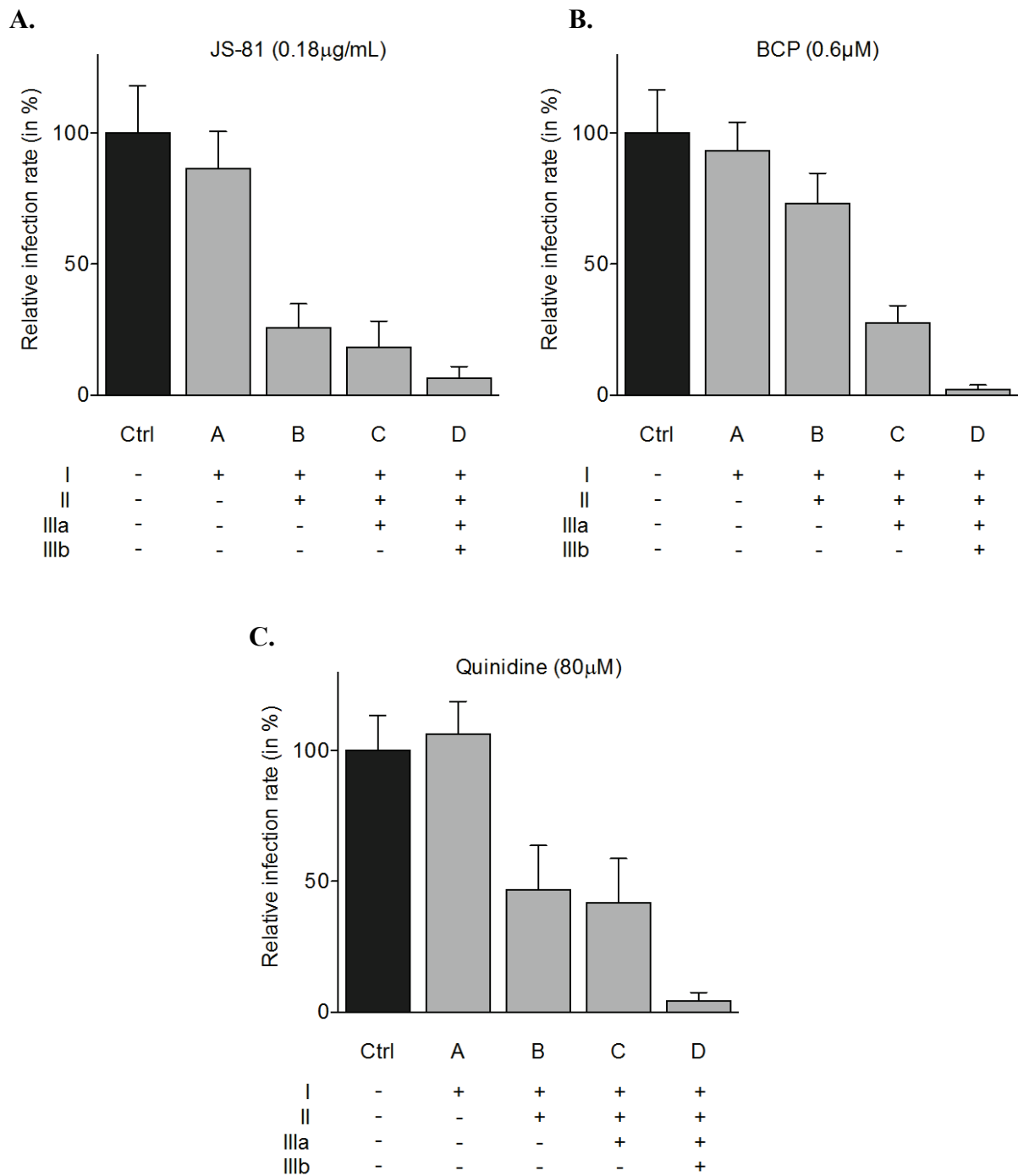


Figure S3: HCV inhibition with characterized HCV inhibitors removed at different times, before or after infection. Huh-7 cells were infected with JFH1 and treated with Mab JS-81, Boceprevir or Quinidine. The inhibitors were removed added at different times, before or after infection as indicated Figure 2E. At 48 h post-infection, infected cells were quantified by indirect immunofluorescence. Results are expressed as percentage of infection compared to the control infection in the presence of solvent.

1
2
3 **Manuscript category:** Original research
4

5 **Quercetin impairs hepatitis C viral life-cycle steps from assembly to replication**
6
7

8
9
10 **Running Head:** Quercetin effect on HCV life cycle
11
12

13
14
15 Ángela Rojas¹, Jose A. Del Campo¹, Sophie Clement², Matthieu Lemasson³, Marta
16
17 García-Valdecasas¹, Isidora Ranchal¹, Arielle R. Rosenberg³, Birke Bartosch⁶, Juan
18
19 Bautista⁵, Francesco Negro^{2,4}, Manuel Romero-Gómez^{1*}
20
21

22
23
24 ¹UCM Digestive Diseases and CIBERehd, Valme University Hospital, University of
25
26 Seville, Sevilla, Spain
27

28
29 ²Division of Clinical Pathology, University Hospital, Geneva, Switzerland
30

31
32 ³Hepatitis C virology, University Paris Descartes, Paris, France
33

34
35 ⁴Division of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital, Geneva,
36
37 Switzerland
38

39
40 ⁵Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Seville,
41
42 Seville, Spain
43

44
45 ⁶Inserm U1052, Cancer Research Center of Lyon, University of Lyon, Lyon, France
46
47 DevWeCan Laboratories of Excellence Network (Labex), Lyon, France
48

49
50
51 ***Author for correspondence:**

52
53 Manuel Romero-Gómez, MD, PhD
54

55
56 Unit for the Clinical Management of Digestive Diseases and CIBERehd,
57

58
59 Hospital Universitario de Valme,
60

Universidad de Sevilla,

1
2
3 41014 Sevilla,
4

5
6 Spain
7

8 Fax: (+34) 955 01 58 99;
9

10 Tel: (+34) 955 01 57 61;
11

12 E-mail: mromerogomez@us.es
13
14

15
16
17 **Keywords:** quercetin, HCV, DGAT activity, lipoviroparticle, lipid droplet
18
19

20
21 **Word count: 3624**
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Objectives: Lipid droplets and diacylglycerol acyltransferase type 1 (DGAT1) are key factors during viral assembly. We evaluated the effect of quercetin on lipid metabolism and HCV viral life cycle.

Design: Huh7.5 and Huh7 cells were either infected with Jc1 and JFH1 infectious particles, or transduced with lentivectors encoding the HCV genotype 3a core protein, and subsequently incubated with quercetin. Genes and proteins involved in lipid metabolism were analysed. DGAT activity was measured as the formation of NBD-triglyceride. NS3-activity was measured *in vitro* using commercial kits. Lipid droplet morphology and core protein subcellular localisation were assessed by immunofluorescence. Entry step was analysed by HCVpp assay. HCV-replication was assessed by quantitative-PCR and the supernatant used for the infectivity assay and HCV-particle production.

Results: Following 72h treatment with 50µM quercetin, *DGAT1* mRNA expression as well as protein activity (%) was inhibited (91.5 ± 1.68 and 62.3 ± 16.4 , respectively). Quercetin decreased lipid droplet volume (μm^3 ; Huh7: 1175 ± 337 ; Huh7+Q50µM: 608 ± 160 ; $p<0.05$) in non-infected cells. Similar effects were observed in core 3a-overexpressing cells. Typical localisation of core protein around lipid droplets was noticeably modified by quercetin. Infectivity assay in Huh7.5.1 and primary hepatocytes were IC_{50} : 37.83 and 23.63µM, respectively. At 50µM, HCV-RNA levels decreased (Huh7.5.1: 39% and PHH: 24%), and HCV-RNA in supernatant decreased $60\%\pm 26.7$ ($p<0.05$) in Huh7.5. *In vitro* NS3 activity was inhibited ($45.4\pm 1.15\%$; $p<0.05$).

Conclusions Quercetin showed direct and host-mediated anti-HCV activity and, as such, highlights a possible new therapeutic target in the management of chronic hepatitis C infection.

Word count = 242

SUMMARY BOX

What is already known about this subject:

- HCV life cycle is strongly associated with lipid metabolism
- Lipid droplets are involved in the assembly step, and DGAT1 interacts with core protein in order to form the viral particle
- Core protein increases lipid droplet size in an *in vitro* model of hepatitis C virus genotype 3a
- Quercetin decreased NS3 activity and HSP70; part of the antiviral activity of this flavonoid

What are the new findings:

In our *in vitro* model

- Quercetin inhibits DGAT activity of hepatitis C virus infection
- Quercetin modifies lipid droplet size and distribution
- In HCV-infected cells, this flavonoid modifies expression of genes and proteins implicated in lipid metabolism
- Quercetin avoids the subcellular localisation between core and lipid droplets affecting the assembly step.

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

Quercetin modifies lipid metabolism by inhibiting DGAT activity, unbalancing the triglyceride – diacylglycerol quotient, and blocking viral assembly. It also acts by directly inhibiting NS3A HCV protein in several *in vitro* models of infection. Dual effect on host and viral proteins make quercetin a potential therapeutic option for patients with hepatitis C infection, including in genotype 3a patients who have reached suboptimal response to interferon-free regimens.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major health problem due to its high prevalence, and the associated morbidity and mortality. It ranges from acute and chronic hepatitis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). HCV is a positive strand RNA virus belonging to the flaviviridae family,[1]. Viral RNA translation leads to the formation of a polyprotein which matures further into ten proteins (both structural and non-structural, NS) that are crucial for HCV life cycle. HCV infection is strongly associated with lipid metabolism. For example: a) It circulates as lipovirions (LVP),[2]; b) higher infectivity of HCV particles are associated with lipoproteins,[3]; c) several receptors are involved such as LDL receptor, Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1),[4], SR-B1 implicated in lipid uptake and LPV entry into the hepatocyte,[5]; d) HCV assembly occurs in close proximity to lipid droplets (LDs),[6,7]; e) Core and NS5A viral protein are found co-localized with LDs,[8]; f) HCV infection promotes accumulation and redistribution of LDs in the perinuclear region,[9]; g) Diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT1), an enzyme that synthesizes triglycerides in the endoplasmic reticulum (ER), interacts with the core protein and is implicated in assembly and maturation of HCV as well as in the formation of new LDs,[10]; h) Apolipoproteins (Apo) B and E, and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) are crucial in the very low-density lipoprotein (VLDL) secretion pathway where the HCV particles are secreted,[11].

Quercetin is one of the most abundant flavonoids present in several components of human diet, including vegetables, fruits, tea and wine,[12]. Quercetin plays a protective role in diseases such as cancer, coronary heart disease and atherosclerosis because it modulates the lipid profile and possesses antioxidant properties,[13]. Quercetin modifies eicosanoid biosynthesis, protects low-density lipoprotein from oxidation, prevents platelet aggregation, and promotes relaxation of cardiovascular smooth muscle,[14]. When taken orally, the highest concentration of quercetin occurs in the liver, lungs and kidneys,[15]. It has been demonstrated that quercetin decreased diacylglycerol acyltransferase activity (DGAT),[16] and inhibited NS3 activity,[17].

The aim of the present study was to investigate the role of lipid metabolism in HCV life cycle, focused on DGAT1 and the therapeutic possibilities of quercetin; a drug able to interact with host as well as viral proteins.

MATERIALS AND METHODS

Reagents, Antibodies, Plasmids and Primers

All reagents, antibodies plasmids and primers used in this study are described in the Supporting Information (Tables 1 and 2).

Cell Culture

Human Huh-7, Huh7.5 and Huh7.5.1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine (all from Invitrogen), 100 U/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin in a humidified atmosphere at 37°C and with 5% CO₂.

Primary human hepatocytes culture

Primary human hepatocytes (PHH, Biopredic, Rennes, France) were isolated from normal-appearing liver tissue obtained from adult patients undergoing partial hepatectomy in the treatment of metastases. The patients were seronegative for HCV, hepatitis B virus, and human immunodeficiency virus, in accordance with French laws and regulations. Primary culture conditions have been described previously,[18]. Briefly, freshly isolated PHH were re-suspended in complete hepatocyte medium consisting of Leibovitz's L-15 medium supplemented with 26 mM NaHCO₃, 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, 100 IU/l insulin (Novo Nordisk), and 10% heat-inactivated fetal calf serum (GE Healthcare), and then seeded onto 12-well plates pre-coated with calf skin type I collagen (Sigma) at a density of 1.5 x 10⁵ viable cells/cm². The medium was replaced 16h later with fresh complete hepatocyte medium supplemented with 1 µM hydrocortisone hemisuccinate (SERB), and cells were left in this medium until HCV inoculation 2 days later. The cultures were maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Effect of quercetin on cell viability

Cell viability was determined with the Trypan blue exclusion test. Three different concentrations of quercetin were assessed (25, 50 and 100 µM).

Cell-cultured HCV production and infection

In vitro-transcribed HCV RNA from Jc1,[19] and JFH-1,[20] (genotype 2a) were

1
2
3 electroporated in Huh7.5 cells using an Amaxa® Nucleofector® II Technology device
4 (program T-14) according to the manufacturer's protocol. Forty-eight hours after
5 electroporation, viral particles produced in the culture medium were titred by
6 immunohistochemistry and the TCID₅₀/mL was calculated. After titration, culture
7 medium with infectious particles was added to treatment-naïve cells (1 MOI) for either
8 48h or 72h.
9
10
11
12

13 14 15 16 ***Lentivirus production and transduction***

17 Lentivector encoding the core protein of genotype 3a_452 (DQ437509) were produced,
18 collected and titrated as previously described,[21]. Untransduced cells, or cells
19 transduced with a lentivector coding for EGFP, were used as controls.
20
21
22

23 24 25 26 ***RNA isolation, retrotranscription and quantitative real-time polymerase chain 27 reaction (RT-PCR)***

28 Total RNA was extracted from the above-treated cells using the guanidine
29 isothiocyanate method,[22]. RNA samples were treated with DNaseI. Total RNA was
30 subjected to reverse transcription (RT) using commercially available kits (QuantiTect
31 Rev. Transcription Kit; Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's
32 instructions.
33
34
35

36 Expression of the genes involved in lipid metabolism *DGATI* (diacylglycerol
37 acyltransferase-1), *DGAT2* (diacylglycerol acyltransferase-2), *FASN* (fatty acid
38 synthase), *ACC* (acetyl-CoA carboxylase), *LDLr* (low-density lipoprotein receptor),
39 *MTP* (microsomal triglyceride transfer protein), *SREBP* (sterol regulatory element-
40 binding protein), *APOB* (apolipoprotein-B), *PPARGgamma* (peroxisome proliferator-
41 activated receptor gamma), and *PNPLA3* (patatin-like phospholipase domain-containing
42 protein 3), as well as intracellular quantification of the negative (-) RNA strand
43 concentration were analysed using real time-PCR (primers listed in Supplementary
44 Table 1) with the Illumina Eco Real-Time PCR. Glyceraldehyde 3-phosphate
45 dehydrogenase (*GAPDH*) gene was used for normalisation and assay control.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56 57 ***Immunoblot analyses***

58 Cells were grown in 6-well plates. After treatment with quercetin, cells were washed
59 twice in ice-cold phosphate buffered saline (PBS), and then lysed using a commercial
60

1
2
3 kit for protein extraction (M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo
4 Scientific). The Bradford assay was used for protein quantification.

5
6 For immunoblot analysis, total proteins were loaded on 10 sodium dodecyl sulphate-
7 polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and the resolved proteins were transferred on to
8 nitrocellulose membranes. The blots were incubated overnight at 4°C with the primary
9 antibodies: anti-β cytoplasmic actin, anti-DGAT1, anti-MTP, anti-FASN, anti-Core and
10 anti-NS3 antibodies (see Supplementary Table 2), washed three times in TRIS-buffered
11 saline (containing 0.1% Tween-20), and probed for 1h with appropriate HRP-
12 conjugated secondary antibody, at room temperature.

13
14 Proteins were detected by chemiluminescence, according to manufacturer's instructions
15 (WesternBright™ ECL, Advansta). Image analysis was performed using ChemiDoc™
16 MP Imaging System (BioRad, Hercules, California, USA).

25 26 ***DGAT activity assay***

27
28 DGAT activity was measured using the method described by McFie et al,[23] based on
29 the use of a fluorescent fatty acyl CoA substrate - {N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol- 4-
30 yl)-methyl]amino} (NBD)-palmitoyl CoA. The formation of a fluorescent product,
31 NBD-triglyceride was then quantified using a molecular imager (Synergy HT, BioTeK).

35 36 37 ***Confocal Microscopy***

38
39 Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 minutes and permeabilised with 0.3%
40 Triton X-100 for 2 minutes before incubation with the primary antibody: anti-Core and
41 Alexa 488-conjugated secondary antibodies. Nuclei were stained with 40,6-diamidino-
42 2-phenylindole (DAPI), and neutral lipids were stained with Oil Red O (ORO) as
43 previously described,[24]. Images were acquired with a confocal microscope
44 (LSM700Meta, Zeiss) and analysed with Metamorph software (Molecular Devices,
45 Sunnyvale, CA).

51 52 53 ***HCV protease assay***

54
55 SensoLyte 520 HCV Protease Assay Kit * Fluorimetric* and HCV NS3/4A protease
56 were purchased from *AnaSpec* (San Jose, CA). A 50µM quercetin solution and 0.2ng of
57 freshly diluted enzyme were added to each well of a 96-well black assay plate (BD
58 Falcon). The reaction was started by adding 25 µL of freshly diluted substrate (1:25 in
59 assay buffer solution). After incubating at room temperature (28°C) for 15 minutes, the
60

1
2
3 fluorescence intensity was measured at Ex/Em: 490/520 nm in a Synergy HT, BioTeK
4 plate reader. Substrate + enzyme reaction with vehicle (DMSO) was used as a positive
5 control (100 % activity). Inhibition percentages were calculated as 100x relative
6
7 fluorescence units (RFU)[(RFU_{quercetin} x 100)/ RFU_{vehicle} = % NS3 activity. 100 - %NS3
8 activity = % inhibition]. All analyses were performed in triplicate.
9
10
11

12 13 14 ***HCV pseudoparticle production***

15 A DNA fragment encoding the last 60 residues of HCV core and all of the E1 and E2
16 proteins was amplified from the serum of a chronic genotype 1b patient. A stop codon
17 was added to the C-terminus of E2 and the resulting fragment ligated into the
18 expression plasmid ph-CMV. The resulting plasmid ph-CMV 1b9.9 was used to
19 produce HCVpp based on the method previously described,[25]. Control
20 pseudoparticles were generated with the VSV-G glycoprotein,[20].
21
22
23
24
25
26
27

28 ***HCV replication and infectivity assays***

29 Replication of HCV genome was measured as the intracellular levels of negative-strand
30 HCV RNA using a strand-specific quantitative RT-PCR technique described
31 previously,[26]. After 72h post-infection, viral RNA in cell culture supernatants was
32 measured using COBAS® TaqMan® HCV Test v2.0 to establish the level of HCV
33 particle production.
34
35
36
37

38 Production of infectious virus was measured as the infectivity titres in filtered culture
39 supernatants using the focus-formation assay, as previously described,[27].
40
41
42

43 ***Determination of IC₅₀***

44 Huh-7.5.1 cells or PHH were inoculated with JFH1-HCV grown in Huh-7.5.1 cells at a
45 MOI of 0.2 and 2.5, respectively. Culture medium was replaced with the inoculum
46 diluted in the smallest volume of fresh complete medium sufficient to cover the cells.
47 After 6h incubation at 37°C, the inoculum was removed, and cells washed 3 times with
48 PBS. The cultures were continued in their respective complete medium containing
49 0.04% dimethyl sulfoxide (DMSO) as carrier control, or with increasing concentrations
50 of quercetin, before quantification of intracellular levels of negative strand HCV RNA
51 and infectivity titres in culture supernatants on day 1 and day 3 post-inoculation,
52 respectively. Data were expressed as percentages of values obtained from carrier control
53 culture medium, and plotted against the quercetin concentration. Prism 5 (GraphPad
54
55
56
57
58
59
60

Software Inc., La Jolla, CA) was used to generate best-fit sigmoidal curves and to determine the IC₅₀ values with 95% confidence intervals.

Statistical analysis

Continuous variables were summarised as means ± SD and categorical variables as frequency and percentage. The Student *t*-test or U-Mann-Whitney exact probability test for categorical data was used for comparisons between groups. Gene expression levels were determined by Delta Ct method. Fold change was calculated as sample/control ratio in three independent experiments in triplicate. Two-sided P values P < 0.001 (***), P < 0.01 (**), and P < 0.05 (*) were considered statistically significant.

Data were collected in a computerised database and analysed using the SPSS package (SPSS 18.0 for Windows, Chicago, IL).

RESULTS

Effect of quercetin on HCV RNA quantification

Quercetin significantly inhibited the intracellular level of HCV RNA by 78.55%±10.49 (p<0.05) in cells infected with Jc1 (1MOI per cell), and by 65.1%±12.5 (p<0.05) in cells infected with JFH-1 relative to the α-interferon-treated cells (500 IU/mL, 100% inhibition) (Figure 1).

Quercetin and NS3 protease activity

To analyse the effect of quercetin on NS3 activity, 50uM of quercetin diluted in DMSO were used and compared to DMSO (vehicle). *In vitro* NS3 activity was inhibited by quercetin by 45.40%±1.15 RFU (p<0.001) compared to the vehicle DMSO (no inhibition) (Figure 2).

Infectivity assay and HCV particle production

Infectivity was assayed using supernatants from infected Huh 7.5.1 cultures and primary hepatocytes infected with JFH.1 and subsequently treated with quercetin. Infectivity assay in Huh7.5.1 and primary hepatocytes were IC₅₀: 37.83 and 23.63 μM respectively. At 50μM, HCV-RNA levels decreased (Huh7.5.1: 39% and PHH: 24%) (Figure 3). Supernatant RNA was quantified using COBAS® TaqMan® HCV Test v2.0. The amount of HCV-RNA (measured as the quantity of viral RNA produced in

1
2
3 the supernatant) was decreased by $60\% \pm 26.7$ ($p < 0.05$) compared to the supernatant
4 from Huh7.5 infected with JFH.1 (1MOI).
5
6
7

8 ***HCVpp assay***

9
10 To analyse the effect of quercetin in the entry step, we used the HCV pseudoparticle
11 assay. The results show that quercetin increased entry of HCVpp particles by $82 \pm 18\%$
12 compared to the non-treated cells (representing 100%).
13
14
15

16 ***Effect of quercetin on lipid metabolism***

17
18 To investigate the effect of quercetin on the expression of genes involved in lipid
19 metabolism, we treated cells with $50\mu\text{M}$ quercetin. Any toxic effects would be observed
20 at this concentration (Supplementary Figure 1). Results showed that expression of genes
21 related to lipid metabolism were modulated by quercetin, in infected as well as in
22 control cells. The impact of quercetin on gene expression, compared to non-infected
23 cells, was more evident at 48h, with a substantial down-regulation of *DGAT1* in
24 infected cells and a moderate down-regulation of *FASN*, *ApoB*, *ACC*, *PNPLA3*, *MTP*,
25 *SREBP*, *LDLr* and *DGAT2* (data not shown). The effect of quercetin on *DGAT1* was
26 even more pronounced at 72h (Figure 4). Of note is that treatment with quercetin was
27 able to prevent the up-regulation of *FASN*, *APOB*, *PNPLA3*, *ACC* and *SREBP* induced
28 by HCV (Figure 4).
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 ***Effect of quercetin on DGAT***

41
42 Since DGAT1 has been previously shown to play an important role on HCV life cycle,
43 we decided to investigate whether the effect of quercetin on its mRNA expression was
44 translated into a decrease in the protein level as well as its activity.
45
46
47
48

49
50 The effect of quercetin on DGAT1 was confirmed at the protein level. Cell infection by
51 Jc1 induced a $3.16\text{-fold} \pm 0.15$ increase of DGAT1, which was almost fully abrogated by
52 treatment with $50\mu\text{M}$ of quercetin for 72h. In addition, quercetin inhibited HCV core
53 and NS3 ($3\text{-fold} \pm 0.02$ and $1.7\text{-fold} \pm 0.03$ decrease, respectively) (Figures 5A and 5B).
54
55
56
57

58
59 DGAT enzyme activity in infected cells was increased relative to non-infected cells
60 ($2.29\text{-fold} \pm 0.23$ $p < 0.01$). This increase was significantly ($p < 0.01$) restricted to
 $63.5 \pm 2.9\%$ by treatment with quercetin (Figure 6).

1
2
3
4
5 ***Effect of quercetin on LD morphology and subcellular localisation of HCV core***
6 ***protein***
7

8
9 We investigated whether the effect of quercetin on lipid metabolism-related genes was
10 accompanied by an effect on LD size. To this aim, Huh7 cells were transduced with
11 lentivectors expressing the HCV core 3a (previously shown to be steatogenic),[28] and
12 neutral lipids were stained with ORO. Complete morphometric LD analyses indicated
13 that the treatment with 50 μ M of quercetin for 72h induced a significant decrease in the
14 mean radius of 19% ($p<0.05$). As a consequence, area and volume decreased by 40 and
15 51%, respectively ($p<0.05$), (Supplementary Figure 2).
16
17
18
19
20
21

22
23 LDs are important in the HCV life-cycle,[7] and, since quercetin has an effect on the
24 size parameters of LDs, we investigated whether quercetin could prevent the well-
25 documented increase in LD size induced by the core protein of HCV genotype 3a. Our
26 results indicated that while the HCV core 3a increased the radius, area and volume of
27 LDs as expected (Figure 7), these HCV core-induced LD modifications were prevented
28 when cells transduced with HCV core 3a-expressing lentivector were concomitantly
29 treated with 50 μ M quercetin [LD area (μm^2): 3a: 109.8 \pm 33.7 vs. 3a + quercetin50 μ M:
30 79.90 \pm 36 ($p<0.001$); LD radius (μm): 3a: 5.85 \pm 0.88 vs. 3a + quercetin50 μ M: 4.91 \pm 1.15
31 ($p<0.05$), LD volume (μm^3): 3a: 894.7 \pm 418.5 vs. 3a + quercetin50 μ M: 577.03 \pm 379.26
32 ($p<0.05$)].
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42
43 In addition, the typical subcellular localisation of the core protein around the LD was
44 disrupted by quercetin treatment in HCV core 3a-transduced cells (Figure 8). HCV core
45 protein displayed a “punctured” pattern throughout the cytoplasm (see inserts in Figure
46 8b). A similar phenomenon was observed in cells infected with 1 MOI JFH-1, as seen
47 on the confocal images (Supplementary Figure 3). Likewise, the core protein was
48 dispersed throughout the cytoplasm following quercetin treatment.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISCUSSION

In the current study, quercetin was observed to: modify lipid metabolism and LD morphology; to inhibit DGAT activity; to decrease core and NS3 protein expression NS3 activity; and pre-empting the subcellular localization of core protein around LD. As such, viral replication was impaired and, in addition, the entry step was modified.

Quercetin modulates the activity of key enzymes in lipid metabolism such as DGAT1 acetyl-CoA carboxylase (ACC) and MTP,[29] thus inhibiting the synthesis of fatty acids, and pre-empting the accumulation of intracellular triacylglycerol. Further, quercetin reduces VLDL production but does not affect endogenous cholesterol biosynthesis via the 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMG-CoA-reductase) pathway,[16,30]. Our results demonstrated that quercetin regulated lipid metabolism-related gene expression, and decreased DGAT protein activity in cells infected with JFH-1.

LDs are organelles for neutral lipids storage, where triglycerides and cholesterol esters are accumulated between the endoplasmic reticulum (ER) bilayer membranes. The droplet is surrounded by a phospholipid monolayer where proteins of the perilipin/ADRP/TIP47 (*PAT*) family are bound. LDs move passively through the cytoplasm and interact with other organelles, including ER. They accumulate in the liver and promote non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD),[31]. LDs play a key role in the HCV life cycle. In HCV infected cells, some viral proteins become associated with LDs. For example, HCV core protein localizes at the LD surface and recruits viral replication complexes to the lipid droplet as the first step of virion assembly; this localization being crucial for virion production,[7]. Our data show that quercetin has an effect on LD size in both non-infected and infected cells. Further, the results indicated that quercetin pre-empting the subcellular localization of core and LD. The model we had used was lentivirus coding for the core protein of HCV genotype 3a.

The effects of quercetin on steatosis and the genes of lipid metabolism have been investigated by Jung *et al.*,[32] who showed that quercetin prevents obesity resulting from a high-fat diet in C57B1/6 mice. The anti-obesity effect was due to the regulation of lipogenesis at the transcription level.

1
2
3
4
5 Hepatitis C virus modifies the expression levels of genes involved in lipid metabolism
6 *in vitro* and *in vivo*,[33]; DGAT being required for triglyceride and LD synthesis,[34].
7
8 Herker et al identified DGAT1 as a host protein required for HCV replication. Earlier
9 we had shown that DGAT1 gene expression was up-regulated in cells infected with
10 JFH1, independently of IL28B genotype,[33]. This protein was overexpressed in
11 peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from patients infected by HCV
12 genotype 1,[33]. Our current results show that DGAT activity is also increased in Huh7
13 cells infected by JFH-1.
14
15
16
17
18
19

20
21 DGAT1 has been shown to interact with the core protein and to be responsible for its
22 trafficking to LDs and, finally, for virion assembly. Inhibition of DGAT1 activity (using
23 either specific inhibitors or interference RNA) restricted localisation of the core to the
24 ER and blocked assembly and release of infectious HCV virions,[10].
25
26
27
28
29

30 Harris *et al*,[34] reported that core protein requires DGAT1 to gain access to LDs.
31 Subsequently, LD-localised core interferes with triglyceride turnover, thus stabilising
32 LDs and promoting steatosis. Their findings indicate that once the core has been
33 localised to LDs, steatosis is caused by the inhibition of lipolysis and slowing-down of
34 triglyceride turnover in LDs. These data support a model in which the core, a single
35 HCV protein, may support viral assembly by at least two distinct mechanisms: the
36 binding to DGAT1 to access LDs; and the inhibition of triglyceride turnover in LDs.
37 The result is an accumulation of LD and, possibly, promotion of viral assembly and
38 steatosis,[34]. Indeed, LDs have been shown to participate in infectious virion
39 production, and viral budding requires the lipoprotein secretion pathway,[35]. Our
40 results demonstrated that DGAT1 is a major target for quercetin and may be the key
41 enzyme in the metabolic pathway to control HCV life cycle. Our data showed using
42 both replicons (JFH-1 and Jc1) that HCV RNA levels were suppressed by exposure to
43 quercetin for 72h. To the best of our knowledge this effect has not been previously
44 reported, and could represent a novel mechanism by which the HCV life-cycle could be
45 artificially interrupted. According to Khachatoorian et al,[36] the quercetin effect would
46 rely on complete blockage of NS5A translation (as measured in an IRES reporter
47 assay), and the inhibition of HSP70 induction.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Quercetin has been shown to have a regulatory effect on lipid metabolism, especially on
4 *DGAT1* inhibition,[16] but also on MTP and intestinal apolipoprotein B,[29] while
5
6 modulating the genes involved in VLDL biosynthesis,[37]. In addition, quercetin has
7
8 been found to reduce fat accumulation in the liver, thus decreasing steatosis-related
9
10 gene expression,[38]. Further, quercetin has been shown to reduce viral replication from
11
12 different origins, such as respiratory syncytial virus,[39,40] and adenoviruses,[41].
13

14
15
16 Treatment with quercetin at non-toxic concentrations of up to 75 μ M) reduced
17
18 infectious HCV-particle production,[42]. Bachmetov *et al*,[17] demonstrated that
19
20 quercetin had a direct inhibitory effect on HCV NS3 serine protease catalytic activity.
21
22 This inhibition may be related to reduction of heat shock protein (HSP40 and HSP70),
23
24 hindering the link between NS5A and HSP,[43]. In our current study, we corroborated
25
26 the inhibitory effect of quercetin on NS3 protease activity,[17] and have shown that
27
28 quercetin has an effect on the activity of host as well as viral proteins such as Core,
29
30 NS3, and DGAT1. Pawlikowska-Pawlęga *et al* showed that quercetin changed the
31
32 properties of the cell membrane. Its effects on lipids, especially fluidisation of
33
34 membrane, are very important for membrane function and could explain, at least in part,
35
36 why quercetin increased the entry of HCVpp,[44].
37

38
39 Quercetin has been tested at doses of 10-20 mg/Kg/day in rats,[45] and at 500 mg/day
40
41 in humans in a trial to reduce cardiovascular disease risk in females with diabetes,[46].
42
43 In a clinical trial (www.clinicaltrials.gov), quercetin was administered as a dietary
44
45 supplement at 4500 mg/day prior to standard treatment of HCV with peg-interferon and
46
47 ribavirin. The trial is ongoing and the full results have not been reported, as yet.
48
49 According to calculated doses from our *in vitro* experiments (50 μ M), 1200 mg would
50
51 be sufficient to reach therapeutic objectives,[47].
52

53
54 In conclusion, our results showed that there was a strong association between chronic
55
56 hepatitis C infection and lipid metabolism; *DGAT1* expression levels and activity being
57
58 induced in the presence of HCV. Quercetin had a major effect on DGAT protein and
59
60 modulation of LD morphology, suggesting that it could interfere with HCV-induced
steatosis and in the virus entry step. Quercetin decreased HCV RNA levels, the
expression of core proteins and NS3 proteins, NS3 activity, and pre-empted Core and
LD subcellular localisation. As such, HCV infection needs certain aspects of lipid

1
2
3 metabolism to fulfil the virus life-cycle e.g. DGAT activity and lipid droplet formation
4 being essential in assembly as well as NS3 activity in the replication step. Quercetin
5 interacts with lipid metabolism by lowering LD size, HCV RNA levels and pre-empting
6 Core and LD subcellular localisation. The antiviral and metabolic effects were seen in
7 cells infected by HCV replicon genotype 2a, and confirmed using core3a. Current
8 therapeutic options in hepatitis C genotype 3a are suboptimal,[48,49] and further studies
9 could demonstrate whether quercetin could become a therapeutic opportunity in this
10 subgroup of patients.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 *Acknowledgments*
4

5 This work was supported by the Spanish Ministry of Economy, Innovation and
6 Competitiveness, *Instituto de Salud Carlos III* PI10/00611, PI13/01192, the Government
7 of Andalusia (PI-0892-2012) and *CIBERehd* which awarded a post-graduate research
8 fellowship to AR.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Current Topics in Microbiol Immunol* 2000;242:55-84.
2. Del Campo JA, Romero-Gómez M. Steatosis and insulin resistance in hepatitis C: A way out for the virus? *World J Gastroenterol* 2009;15:5014-5019.
3. André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, et al. Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *J Virol* 2002;76:6919-6928.
4. Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 2012;18:281-285.
5. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:453-463.
6. Meester I, Rosas-Taraco AG, Solís-Soto JM, Salinas-Carmona MC. The roles of lipid droplets in human infectious disease. *Medicina Universitaria* 2011;13:207-216.
7. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007;9:1089-1097.
8. Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, et al. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1200-1205.
9. Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratinier M, Targett-Adams P, Lavergne JP, et al. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 2006;281:22236-22247.
10. Herker E, Harris C, Hernandez C, Carpentier A, Kaehlcke K, Rosenberg AR, et al. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med* 2010;16:1295-1298.
11. Diaz O, Delers F, Maynard M, Demignot S, Zoulim F, Chambaz J, et al. Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *J Gen Virol* 2006;87:2983-2991.

12. Bravo L. Polyphenols; chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutri Rev* 1998;56:317-333.
13. Prior RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 2003;78:570S-578S.
14. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995;33:1061-1080.
15. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 2008;585:325-337.
16. Gnoni GV, Paglialonga G, Siculella L. Quercetin inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat-liver cells. *Eur J Clin Invest* 2009;39:761-768.
17. Bachmetov L, Gal-Tanamy M, Shapira A, Vorobeychik M, Giterman-Galam T, Sathiyamoorthy P, et al. Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. *J Viral Hepat* 2012;19:e81-88.
18. Podevin P, Carpentier A, Pène V, Aoudjehane L, Carrière M, Zaïdi S, Hernandez C, Calle V, Méritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset FL, Wakita T, Bartenschlager R, Demignot S, Conti F, Rosenberg AR, Calmus Y. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* 2010;139:1355-1364
19. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7408-7413.
20. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-796.
21. Clément S, Pascarella S, Conzelmann S, Gonelle-Gispert C, Guilloux K, Negro F. The hepatitis C virus core protein indirectly induces alpha-smooth muscle actin expression in hepatic stellate cells via interleukin-8. *J Hepatol* 2010;52:635-643.
22. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
23. McFie Pamela J, Stone Scot J. A fluorescent assay to quantitatively measure in vitro acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase activity *J Lipid Res* 2011;52:1760-1764.
 24. Clement S, Juge-Aubry C, Sgroi A, Conzelmann S, Paziienza V, Pittet- Cuenod B, Meier C.A, Negro F. Monocyte chemoattractant protein-1 secreted by adipose tissue induces direct lipid accumulation in hepatocytes. *Hepatology* 2008;48:799-807.
 25. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*. 2003;197:633-642.
 26. Carrière M, Pène V, Breiman A, Conti F, Chouzenoux S, Meurs E, Andrieu M, Jaffray P, Grira L, Soubrane O, Sogni P, Calmus Y, Chaussade S, Rosenberg AR, Podevin P. A novel, sensitive, and specific RT-PCR technique for quantitation of hepatitis C virus replication. *J Med Virol* 2007;79:155-160.
 27. Pène V, Hernandez C, Vauloup-Fellous C, Garaud-Aunis J, Rosenberg AR. Sequential processing of hepatitis C virus core protein by host cell signal peptidase and signal peptide peptidase: a reassessment. *J Viral Hepat* 2009;16:705-715.
 28. Abid K, Paziienza V, de Gottardi A, Rubbia-Brandt L, Conne B, Pugnale P, Rossi C, Mangia A, Negro F. An in vitro model of hepatitis C virus genotype 3a-associated triglycerides accumulation. *J Hepatol*. 2005;42:744-751.
 29. Casaschi A, Rubio BK, Maiyoh GK, Theriault AG. Inhibitory activity of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) by the flavonoid, taxifolin, in HepG2 cells: potential role in the regulation of apolipoprotein B secretion. *Atherosclerosis*. 2004;176(2):247-53.
 30. Park J, Ahn J, Kim S, Ha TY. Quercetin suppresses the hyperlipidemia induced by atherogenic diet in mice. *FASEB J* 2008;22;707.
 31. Sahini N, Borlak J. Recent insights into the molecular pathophysiology of lipid droplet formation in hepatocytes. *Prog Lipid Res* 2014;54:86-112.
 32. Jung CH, Cho I, Ahn J, Jeon TI, Ha TY. Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes. *Phyther Res* 2013;27:139-143.
 33. Rojas A, Del Campo JA, Maraver M, Aparcero R, García-Valdecasas M, Diago M, Carmona I, Andrade R.J, Sola R, Romero-Gomez M. Hepatitis C virus

- infection alters lipid metabolism depending on IL28B polymorphism and viral genotype and modulates gene expression in vivo and in vitro. *J Viral Hepat* 2014;21:19-24.
34. Harris C, Herker E, Farese RV. Hepatitis C virus core protein decreases lipid droplet turnover: a mechanism for core-induced steatosis. *J Biol Chem* 2011;286:42615-42625.
35. Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 2008;82:2120-2129.
36. Khachatourian R, Arumugaswami V, Raychaudhuri S, Yeh GK, Maloney EM, Wang J, et al. Divergent antiviral effects of bioflavonoids on the hepatitis C virus life cycle. *Virology* 2012;433:346-355.
37. Fujino T, Nakamuta M, Yada R, Aoyagi Y, Yasutake K, Kohjima M, et al. Expression profile of lipid metabolism-associated genes in hepatitis C virus-infected human liver. *Hepatol Res* 2010;40:923-929.
38. Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Oike H. Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:530-540.
39. Kaul TN, Middleton E Jr, Ogra PL. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol* 1985;15:71-79.
40. Davis JM, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Gangemi JD. Quercetin reduces susceptibility to influenza infection following stressful exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R505-509.
41. Chiang LC, Chiang W, Liu MC, Lin CC. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:194-198.
42. Bhattacharya D, Ansari IH, Mehle A, Striker R. Fluorescence resonance energy transfer-based intracellular assay for the conformation of hepatitis C virus drug target NS5A. *J Virol* 2012;86:8277-8286.
43. Gonzalez O, Fontanes V, Raychaudhuri S, Loo R, Loo J, Arumugaswami V, et al. The heat shock protein inhibitor quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology* 2009;50:1756-1764.
44. Pawlikowska-Pawlega B1, Gruszecki WI, Misiak L, Paduch R, Piersiak T, Zarzyka B, Pawelec J, Gawron A. Modification of membranes by quercetin, a

- 1
2
3 naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group.
4
5 Biochim Biophys Acta. 2007;1768:2195-2204.
6
7 45. Casella ML, Parody JP, Ceballos MP, Quiroga AD, Ronco MT, Francés DE, et
8
9 al. Quercetin prevents liver carcinogenesis by inducing cell cycle arrest,
10 decreasing cell proliferation and enhancing apoptosis. Mol Nutr Food Res 2013;
11 00:1-12.
12
13 46. Zahedi M, Ghiasvand R, Feizi A, Asgari G, Darvish L. Does quercetin improve
14 cardiovascular risk factors and inflammatory biomarkers in women with type 2
15 diabetes: A double-blind randomized controlled clinical trial. Int J Prev Med
16 2013;4:777-785.
17
18 47. Sun B, Ross SM, Trask OJ, Carmichael PL, Dent M, White A, et al. Assessing
19 dose-dependent differences in DNA-damage, p53 response and genotoxicity for
20 quercetin and curcumin. Toxicol In Vitro 2013;27:1877-1887
21
22 48. Zeuzem S, Dusheiko GM, Salupere R, Mangia A, Flisiak R, Hyland RH,
23 Illeperuma A, Svarovskaia E, Brainard DM, Symonds WT, Subramanian GM,
24 McHutchison JG, Weiland O, Reesink HW, Ferenci P, Hézode C, Esteban R;
25 VALENCE Investigators. Sofosbuvir and ribavirin in HCV genotypes 2 and 3.
26 N Engl J Med 2014;370:1993-2001.
27
28 49. Ampuero J, Romero-Gómez M, Reddy KR. Review article: HCV genotype 3 –
29 the new treatment challenge. Aliment Pharmacol Ther 2014;39:686-698.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure Legends

Figure 1: Percentage intracellular level of HCV RNA in cells infected with Jc1 and JFH-1 compared with α -interferon-treated cells (500 IU/mL, 100% inhibition)

Figure 2: *In vitro* activity of HCV NS3 measured using SensoLyte[®] 520 HCV Protease, and compared to the vehicle (DMSO)

Figure 3: Production of infectious virus was measured as the infectivity titres in filtered culture supernatants with focus-formation assay in the absence (a) or presence (b) of quercetin (50 μ M). Replication of HCV genome was measured as the intracellular levels of negative-strand HCV RNA in (c) non-treated cells and (d) treated with quercetin (50 μ M)

Figure 4: *In vitro* gene expression levels. Several-fold gene expression in Huh-7 cells infected with Jc1 (1Moi/cell) and exposed for 72h to 50 μ M quercetin (Q50 μ M). Experiments were performed in triplicate. Control experiments (non-infected cells) were used as reference (induction = 1-fold) (*) $p < 0.05$; and infected cells with Jc1 as reference (**) $p < 0.05$.

Figure 5: Western blot from Huh7 cells in the presence or absence of quercetin (50 μ M) and infected or not with Jc1 particles. A representative gel is shown for each protein. β -actin was used as a loading control.

Figure 6: DGAT enzyme activity in cells infected with JFH-1 particles (1MOI) and treated with quercetin (50 μ M), compared to non-infected cells.

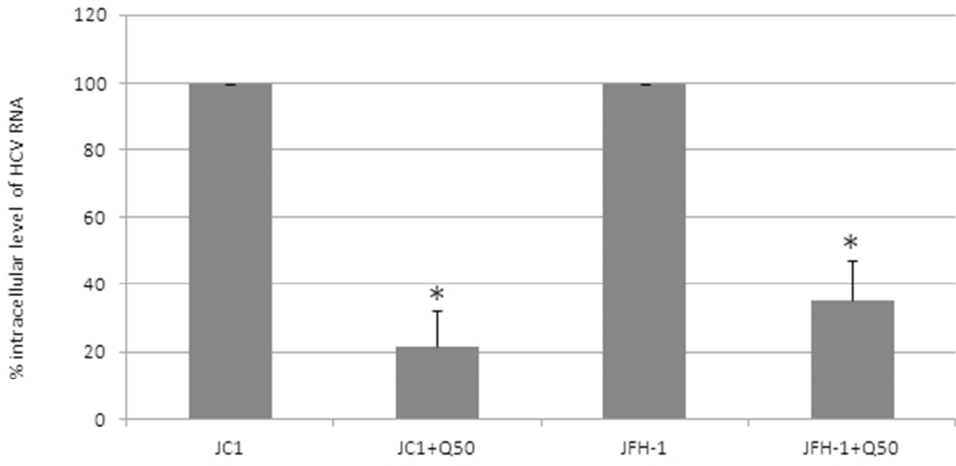
Figure 7: Huh7 cells transduced with lentivector encoding the HCV genotype 3a core protein and treated with quercetin (50 μ M). Data on LD size (area, radius and volume) were generated from the MetaMorph Microscopy Automation & Image Analysis software. Experiments were performed in triplicate.

Figure 8: Huh7 cells transduced with lentivector encoding the HCV genotype 3a core protein (DQ437509), and treated with quercetin 50 μ M for 72h. Core protein was

1
2
3 detected with specific antibody (green). LD and nuclei were stained with ORO (red) and
4 Dapi (blue), respectively. Images were obtained with the spinning disk using a 100x
5 objective confocal microscope (LSM510 Meta, Zeiss) and analysed with Metamorph
6 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

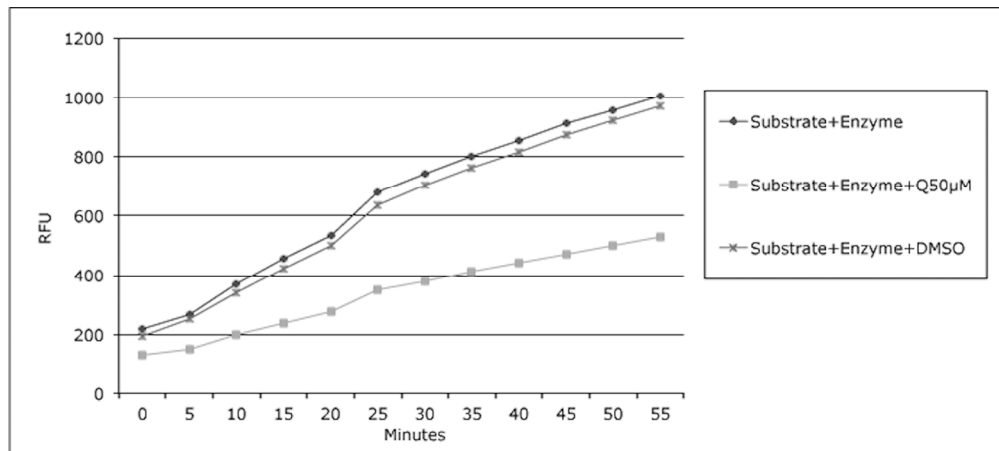
Confidential: For Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

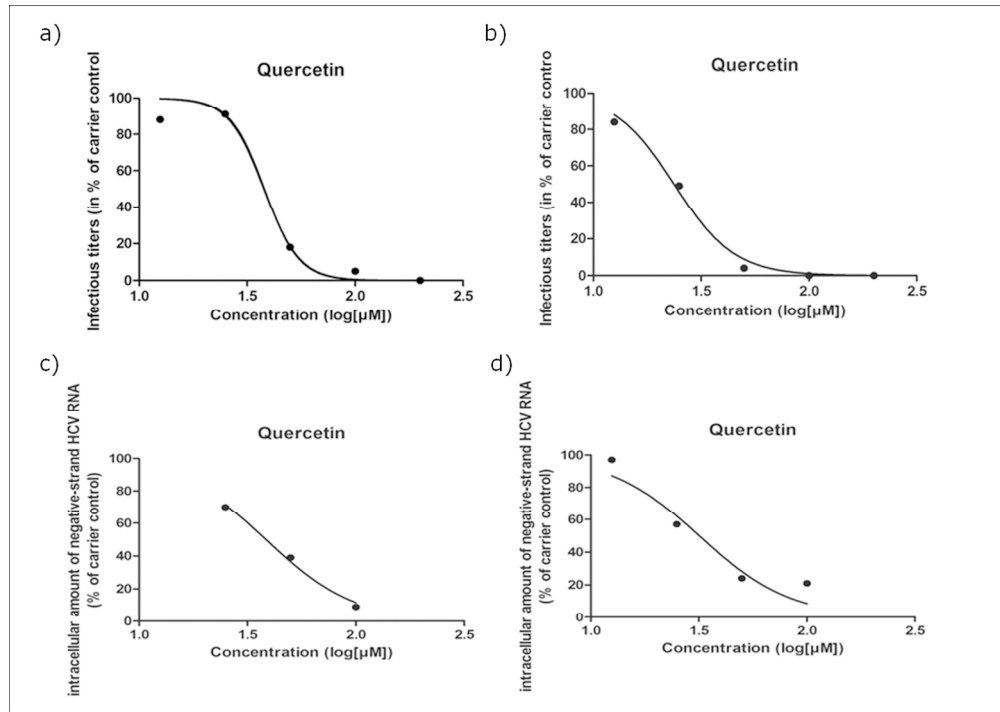


Percentage intracellular level of HCV RNA in cells infected with Jc1 and JFH-1 compared with α -interferon-treated cells (500 IU/mL, 100% inhibition) 52x24mm (300 x 300 DPI)

For Review Only

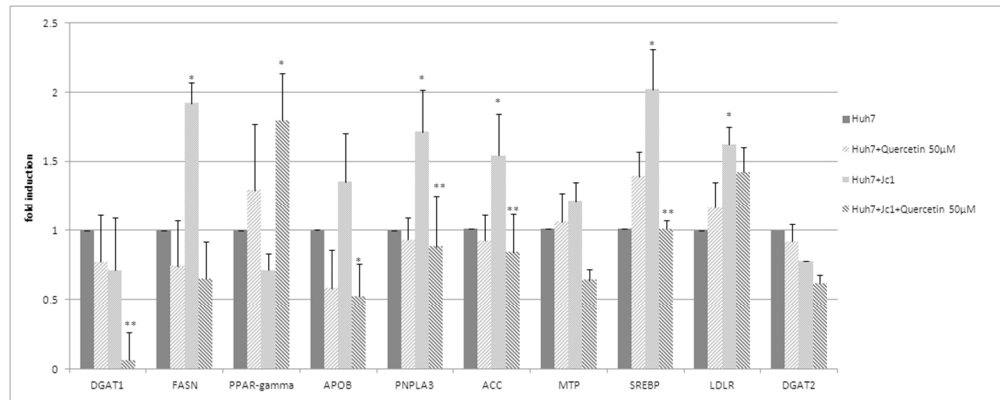


In vitro activity of HCV NS3 measured using Sensolyte® 520 HCV Protease, and compared to the vehicle (DMSO)
244x110mm (300 x 300 DPI)



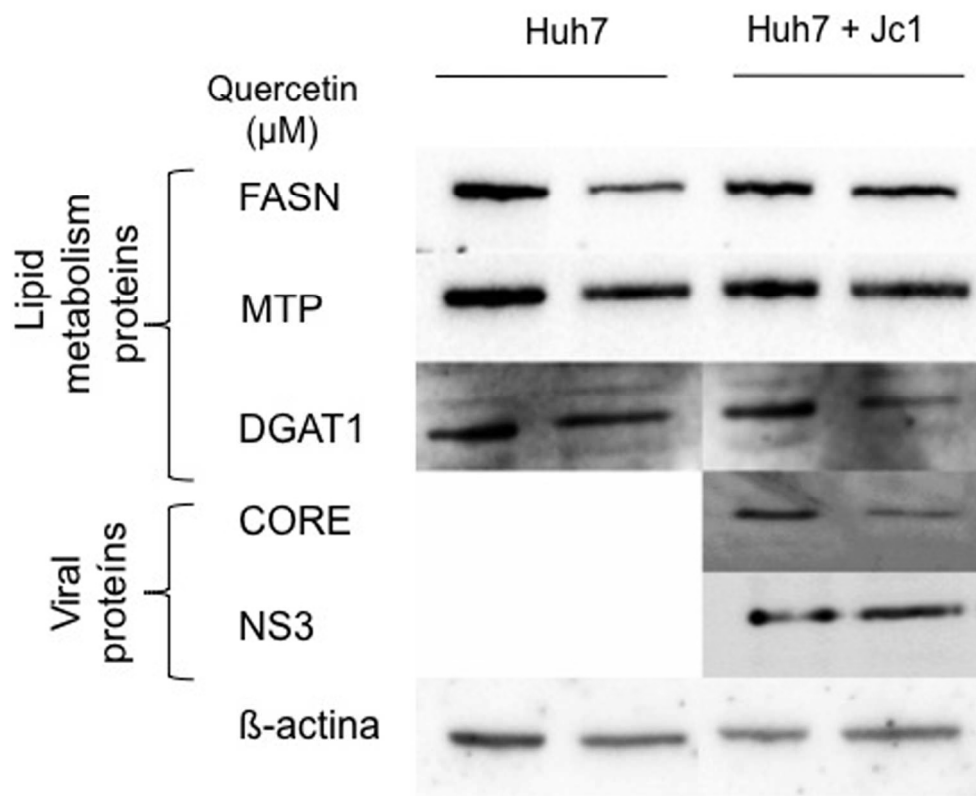
Production of infectious virus was measured as the infectivity titres in filtered culture supernatants with focus-formation assay in the absence (a) or presence (b) of quercetin (50μM). Replication of HCV genome was measured as the intracellular levels of negative-strand HCV RNA in (c) non-treated cells and (d) treated with quercetin (50μM)

254x180mm (300 x 300 DPI)



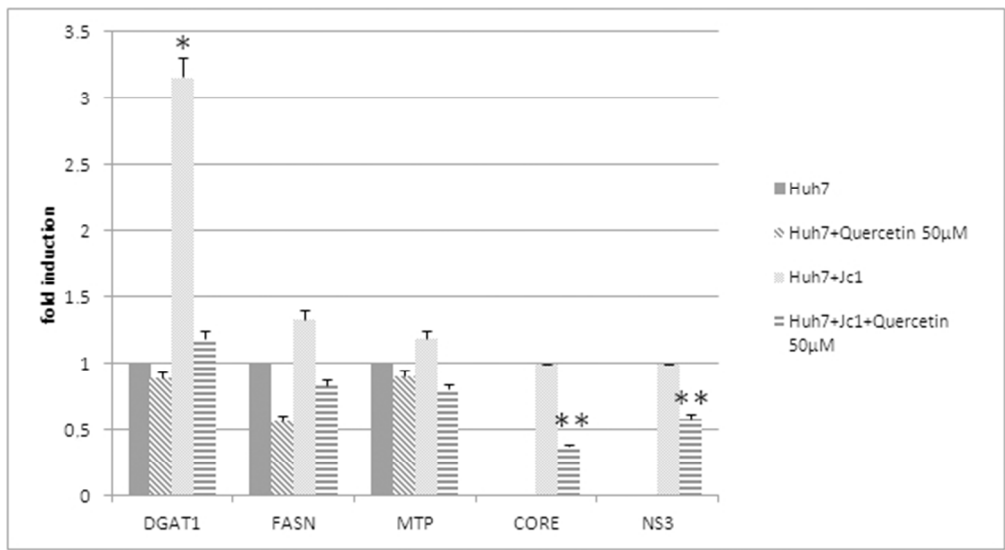
In vitro gene expression levels. Several-fold gene expression in Huh-7 cells infected with Jc1 (1Moi/cell) and exposed for 72h to 50µM quercetin (Q50 µM). Experiments were performed in triplicate. Control experiments (non-infected cells) were used as reference (induction = 1-fold) (*) p<0.05; and infected cells with Jc1 as reference (***) p<0.05.

92x36mm (300 x 300 DPI)



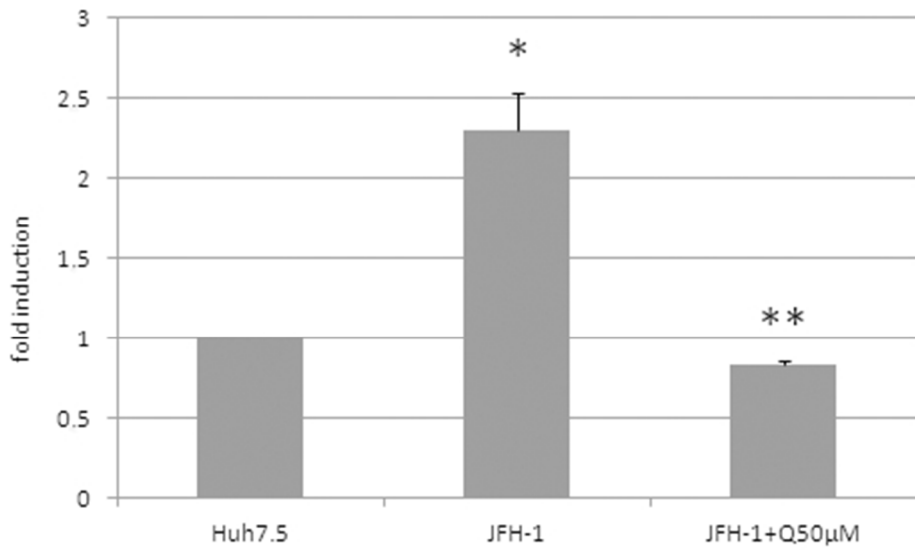
34 Western blot from Huh7 cells in the presence or absence of quercetin (50 μM) and infected or not with Jc1
 35 particles. A representative gel is shown for each protein. βactin was used as a loading control.
 36 161x129mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



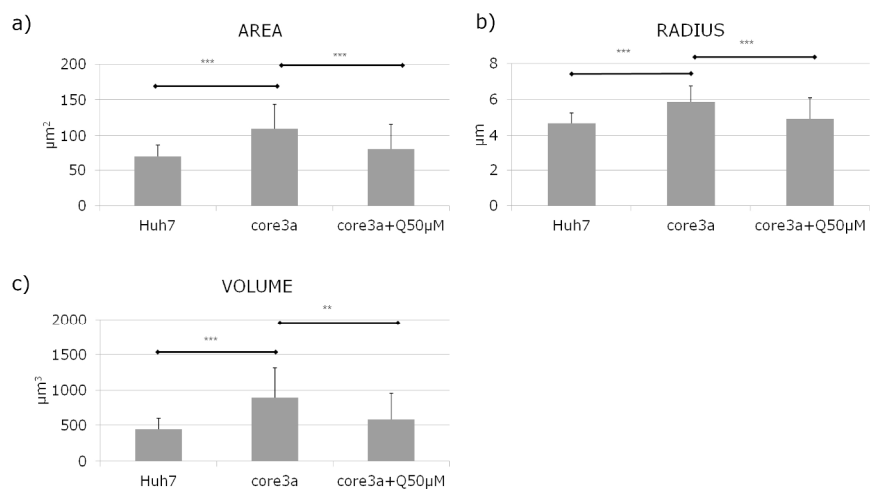
53x29mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

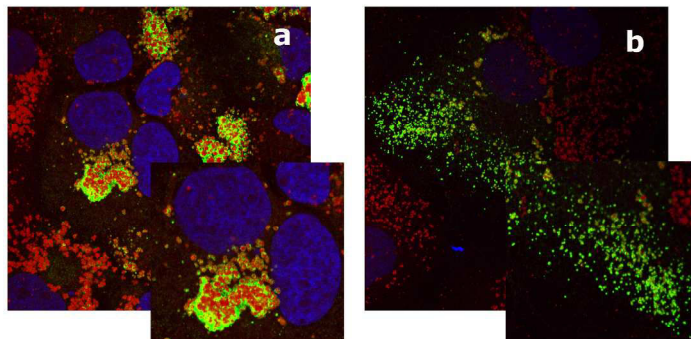


DGAT enzyme activity in cells infected with JFH-1 particles (1MOI) and treated with quercetin (50µM), compared to non-infected cells.
39x23mm (300 x 300 DPI)

For Review Only



Huh7 cells transduced with lentivector encoding the HCV genotype 3a core protein and treated with quercetin (50µM). Data on LD size (area, radius and volume) were generated from the MetaMorph Microscopy Automation & Image Analysis software. Experiments were performed in triplicate.
291x157mm (300 x 300 DPI)



Huh7 cells transduced with lentivector encoding the HCV genotype 3a core protein (DQ437509), and treated with quercetin 50 μ M for 72h. Core protein was detected with specific antibody (green). LD and nuclei were stained with ORO (red) and Dapi (blue), respectively. Images were obtained with the spinning disk using a 100x objective confocal microscope (LSM510 Meta, Zeiss) and analysed with Metamorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).
297x209mm (300 x 300 DPI)

Supplementary information

Supplementary Figure 1: Cytotoxic effect of quercetin. Cell viability was confirmed with the trypan blue exclusion method.

Supplementary Table 2: List of antibodies used in the experiments.

Supplementary Table 3: List of primers used in the experiments.

Supplementary Figure 2A: Huh7 cells; (a) treated with quercetin 50 μ M; (b) for 72h. Cells were fixed with PFA (4%), permeabilised with triton (0.2%). LD and nuclei were stained with ORO and Dapi, respectively. Fluorescent images in treated cells (a) and untreated cells (b) were captured using the x100 objective lens of a confocal microscope fitted with LSM510 Meta lens (Zeiss)

Supplementary Figure 2B: LD dimensions (size, radius, area, volume) were obtained by MetaMorph Microscopy Automation & Image Analysis software. Experiments were performed in triplicate.

Supplementary Figure 3: Huh7 cells infected with JFH-1 particles; (a): 1 Moi per cell and treated with quercetin 50 μ M; (b): Core protein detected with specific antibody (green): LD and nuclei were stained with ORO (red) and Dapi (blue), respectively. Images were acquired using x100 objective lens of a confocal microscope fitted with LSM510 Meta (Zeiss) and analysed with Metamorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

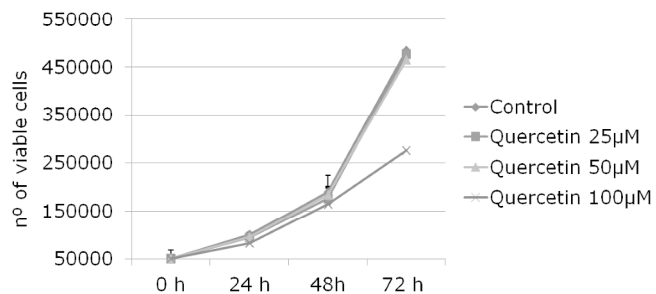
Supplementary Tables

Supplementary Table 1: List of Antibodies

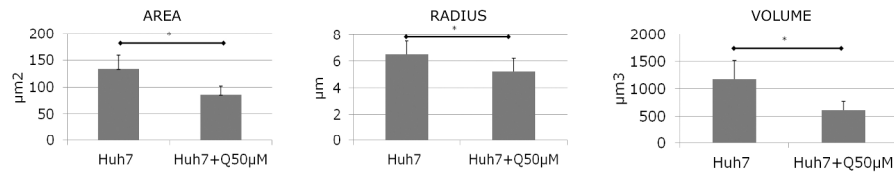
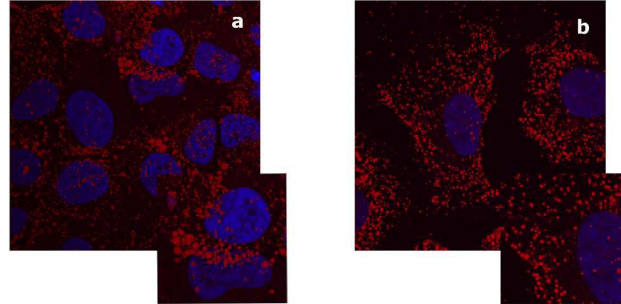
Protein	Cat. Nº	Company
B-actin	#4967	Cell signaling
DGAT1	sc271934	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
MTP	sc33116	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
FASN	sc55580	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-mouse	PAB0096	Abnova
Anti-rabbit	#7074	Cell signaling
Core	ALX-804-277	Enzo Life Science
NS3	Anti-NS3 (JFH-1) Monoclonal Clone 2E3	Biofronttech
antigoat	sc2020	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Supplementary Table 2: List of primers

Gene Symbol	Cat. no	Company
GAPDH	QT00079247	QIAGEN
DGAT1	QT00087192	QIAGEN
FASN	QT00014588	QIAGEN
PPAR-gamma	QT00029841	QIAGEN
APOB	QT00020139	QIAGEN
PNPLA3	QT00055419	QIAGEN
ACC	QT00033761	QIAGEN
MTP	QT00043050	QIAGEN
SREBP	QT00036897	QIAGEN
JFH-2 fwd/rev	fwd-CTGTGAGGAAGTACTGTCT reverse: CGCCCTATCAGGCAGTACCA.	NON COMMERCIAL
KK30/KM3	5'-CTGTCTTCACGCAGAAAGCG-3' 5'-CATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGCA-3''	NON COMMERCIAL



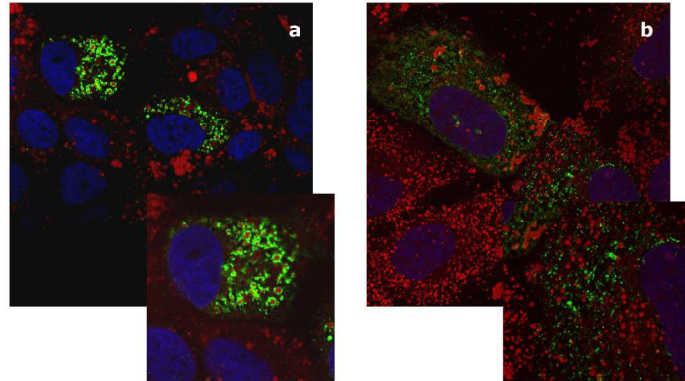
Cytotoxic effect of quercetin. Cell viability was confirmed with the trypan blue exclusion method.
296x209mm (300 x 300 DPI)



Supplementary Figure 2A: Huh7 cells; (a) treated with quercetin 50 μM ; (b) for 72h. Cells were fixed with PFA (4%), permeabilised with triton (0.2%). LD and nuclei were stained with ORO and Dapi, respectively. Fluorescent images in treated cells (a) and untreated cells (b) were captured using the x100 objective lens of a confocal microscope fitted with LSM510 Meta lens (Zeiss)

Supplementary Figure 2B: LD dimensions (size, radius, area, volume) were obtained by MetaMorph Microscopy Automation & Image Analysis software. Experiments were performed in triplicate.

297x209mm (300 x 300 DPI)



Huh7 cells infected with JFH-1 particles; (a): 1 Moi per cell and treated with quercetin 50 μ M; (b): Core protein detected with specific antibody (green): LD and nuclei were stained with ORO (red) and Dapi (blue), respectively. Images were acquired using x100 objective lens of a confocal microscope fitted with LSM510 Meta (Zeiss) and analysed with Metamorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).
297x209mm (300 x 300 DPI)