



HAL
open science

Etude de la dynamique spatiotemporelle des interactions VHC-récepteurs

Camille Clement

► **To cite this version:**

Camille Clement. Etude de la dynamique spatiotemporelle des interactions VHC-récepteurs. Virologie. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ098 . tel-04416325

HAL Id: tel-04416325

<https://theses.hal.science/tel-04416325v1>

Submitted on 25 Jan 2024

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.

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 7213 et UMR 9004

THÈSE présentée par :

Camille CLEMENT

soutenue le : **16 Décembre 2019**

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

Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Etude de la dynamique
spatiotemporelle des interactions
VHC-récepteurs**

THÈSE dirigée par :

M. GAUDIN Raphaël

M. MELY Yves

Chargé de recherche, CNRS UMR 9004 IRIM Montpellier

Professeur, CNRS UMR 7213 Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. DUBUISSON Jean

Mme MOUGEL Marylène

Directeur de recherche, Institut Pasteur de Lille

Directeur de recherche, UMR 9004 IRIM Montpellier

AUTRES MEMBRE DU JURY :

M. Ruff Marc

M. LUPBERGER Joachim

Directeur de recherche, IGBMC Université de Strasbourg

Chargé de recherche, Inserm U1110 Université de Strasbourg

A mon grand-père,
Clément Jean
(1932-2019)

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse : mes rapporteurs, M. Dubuisson Jean et Mme Mougel Marylène d'avoir accepté d'évaluer mes travaux, ainsi que M. Lupberger Joachim de bien vouloir être mon examinateur.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse M. Gaudin Raphael. Il m'a permis d'effectuer mes premiers pas en tant que chercheur au sein de son équipe. J'ai eu l'opportunité d'apprendre et de me surpasser durant cette thèse qui n'a pas été de tout repos. Ses conseils ainsi que la transmission de sa passion pour la recherche, ont fait de moi la scientifique que je suis aujourd'hui. Il a su me soutenir dans les périodes les plus difficiles, ce qui m'a permis d'atteindre mes objectifs. Je le remercie sincèrement pour tout.

Je remercie mon co-directeur M. Yves Mély pour la collaboration que j'ai effectuée dans son laboratoire avec l'aide de M. Ronde Philippe. Je les remercie pour leur accueil chaleureux et leur aide dans mon projet.

Je remercie aussi la plateforme d'imagerie et de cytométrie (MRI) de Montpellier pour leur support. Plus particulièrement M. Faklaris Orestis (MRI), ainsi que Gonzalez-Espeso Reyes Iria (IGMM) pour leurs conseils lors du marquage et de l'observation d'explant de foie humain.

Au sein de mon équipe, j'ai pu côtoyer et rencontrer des personnes formidables qui au fil du temps sont devenues des amis. Si j'ai pu en arriver là aujourd'hui c'est grâce à eux : Cristina, Maïka, Vanesa, Vincent, Emma.

Cristina, tu as été mon second mentor, tu m'as guidé et formé à mes débuts, tu m'as montré la voie pour ne rien lâcher. Maïka grâce à tes conseils avisés et ton expérience tu m'as permis de m'épanouir sur le plan professionnel comme personnel. Vanesa tu as toujours eu les mots qu'il fallait aux moments les plus opportuns pour m'accompagner. Vincent, l'expert en biologie moléculaire, tu avais toujours la solution à une PCR qui ne marchait pas et ta bonne humeur était contagieuse. Emma ton énergie et ton éternel optimisme m'ont fait le plus grand bien. Cette équipe est devenue un peu comme une seconde famille, au sein de laquelle je me suis vue évoluer et avec qui j'ai pu tout partager.

Ma thèse a été une aventure scientifique et humaine, j'ai eu la chance d'échanger avec de nombreux scientifiques dans le cadre de congrès mais aussi au sein des deux instituts qui m'ont accueillie. Je remercie les deux directeurs des unités de recherches que j'ai pu intégrer au cours de ma thèse M. Baumert Thomas (U1110 à Strasbourg) et M. Mesnard Jean-Michel (UMR 9004 Montpellier).

Je voudrai également remercier les membres de l'U1110 et l'UMR 9004 avec qui j'ai pu travailler tout au long de ma thèse : Laura, Charlotte, Sarah, Gaëtan, Antonio, Emilie, Clara, Andres, Vincent, merci à vous tous pour ces agréables moments d'échanges, de rigolades et de sciences que nous avons pu partager durant les 2 premières années de ma thèse au sein l'U1110 à Strasbourg. Peggy, Aurore, Kaushik mes nouveaux compagnons de bureau à mon arrivée à Montpellier et leurs chefs d'équipe Delphine et Cyril, merci de m'avoir si bien accueillie lors de ma dernière année de thèse. Merci à tous les membres de l'IRIM, notamment Eric, Camille, Patrick, Charlotte, Pascale, Lucile, Juliette, Mathilde, Antoine, Sarah, Alice, Christophe, Ghizlane, Célia, Fabien et tous les autres, pour m'avoir soutenue et écoutée quand je me plaignais aux pauses-café.

Ce déménagement de Strasbourg à Montpellier fut riche en découvertes amicales mais j'ai eu aussi la chance de rencontrer Benjamin, merci de partager ta vie avec moi et de m'avoir supportée durant ces derniers mois d'écriture.

Un énorme merci à ma famille : A mes parents Michel et Marie-Hélène pour leur soutien infaillible. Bien que mon domaine soit à des années lumières du leur, ils ont toujours été ravis de m'écouter parler de mes travaux de recherches et ils ont pris le temps de corriger les fautes d'orthographe de mon manuscrit de thèse (ce qui n'était pas gagné d'avance avec ma dyslexie). Merci d'avoir été là lors de mes coups de mou pour m'encourager et me remettre d'attaque. A ma sœur qui m'a fait le plus grand des honneurs en me proposant de devenir la marraine de son fils durant ma première année de thèse. La famille s'agrandit, Michel, Marie-Hélène, Kevin, Sophie, Kentin et Elias merci pour tous vos encouragements et votre soutien.

Pour finir je voudrais dédier ce manuscrit à mon grand-père Jean Clément, qui a combattu contre la maladie ces deux dernières années. Tu es pour moi une grande source d'inspiration, par le courage et la détermination dont tu as fait preuve dans cette lutte et tout au long de ta vie.

Table des matières

Remerciements	4
Table des matières	7
Liste des tableaux	10
Liste des figures	11
Liste des annexes.....	14
Liste des abréviations	15
Introduction	18
I. Généralités sur le VHC	18
1. Découverte du VHC	18
2. Epidémiologie du VHC	19
3. Mode de transmission du VHC	21
II. Histoire naturelle du VHC.....	22
1. Infection aiguë.....	22
2. Infection chronique	23
3. Manifestation extra-hépatiques	24
III. Réponse immunitaire contre le VHC	26
1. Réponse immunitaire innée	26
2. Réponse immunitaire adaptative	29
3. Contre-attaque du VHC face au système immunitaire.....	30
a) Echappement au système immunitaire inné	31
b) Echappement au système immunitaire adaptatif	32
IV. Diagnostic et traitement du VHC	34
1. Les marqueurs viraux et cellulaires de l'infection par le VHC	34
2. Diagnostic.....	35
3. Traitement de l'hépatite C.....	36
a) Premier traitement contre le VHC.....	37
b) Les agents antiviraux à action directe	38
c) Les agents antiviraux à action indirecte	40
V. Le virus de l'hépatite C	42
1. Classification et génotype	42
2. La particule virale.....	43

3.	L'organisation génomique.....	45
4.	Les protéines virales.....	46
a)	Les protéines structurales	46
	La protéine core.....	46
	Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2	48
b)	Les protéines non structurales	49
	La viporine p7	49
	La protéase NS2	50
	Le complexe NS3-4A.....	50
	NS4B	51
	La phosphoprotéine NS5A	52
	L'ARN polymérase ARN dépendante NS5B.....	53
5.	Le cycle viral.....	54
a)	L'entrée virale	54
b)	La traduction	54
c)	La réplication.....	57
d)	Assemblage et Sécrétion	59
VI.	Les modèles d'études du VHC.....	61
1.	Modèles animaux	61
2.	Les modèles cellulaires	63
3.	Les modèles de virions.....	64
VII.	Dynamique d'interaction du VHC et ces récepteurs.....	66
1.	L'interaction virus-récepteur(s).....	66
2.	La dynamique d'interaction virus-récepteurs.....	67
a)	La stratégie « colle (<i>stick</i>) »	68
b)	La stratégie « cherche (<i>seek</i>) »	68
c)	La stratégie « préformé (<i>preformed</i>) »	69
d)	La stratégie « colle et cherche (<i>stick and seek</i>) »	69
3.	Les molécules de surfaces cellulaires impliquées dans l'entrée du VHC	70
a)	Les facteurs d'attachements LDL-R et HSPG	71
b)	Tetraspanin CD81	72
c)	Scavenger-receptor Type B class I SR-BI.....	73
d)	Les facteurs d'entrée EGFR and Eph2A sont des récepteurs tyrosines	73

e) Les facteurs d'entrée associés aux jonctions serrées CLDN1 et OCLN	75
Les Jonctions serrées	75
Occludin	76
Claudin-1	78
4. La dynamique d'interaction VHC-récepteurs	80
OBJECTIF.....	84
MATERIELS ET METHODES.....	86
RESULTATS PREMIERE PARTIE Génération des outils biologiques pour l'imagerie en temps réel	102
1. Génération de lignées éditées Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1 et EGFP-OCLN.....	102
a) Validation de l'édition.....	105
b) Caractérisation de l'influence de l'édition sur la localisation des protéines	108
c) Caractérisation de l'influence de l'étiquette sur la fonction des protéines	110
2. Génération de lignées invalidées génétiquement pour la CLDN1	112
3. Génération de particules de VHC fluorescentes	114
RESULTATS DEUXIEME PARTIE Etude de la dynamique spatiotemporelle des interactions VHC-récepteurs.....	117
I. Permissivité des lignées cellulaires éditées aux VHC.....	117
II. Dynamique spatiotemporelle d'interaction VHC-OCLN	122
1. L'association VHC-OCLN se produit hors des jonctions serrées.....	122
2. L'association VHC-OCLN diminue la mobilité du complexe.....	125
DISCUSSION	127
I. Génération d'outils biologiques pour l'imagerie sur cellules vivantes	127
II. Etude de la dynamique d'interaction spatiotemporelle VHC-OCLN	131
CONCLUSION GENERALE	134
Bibliographie.....	136
Annexes 1	172
Annexes 2.....	197

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableaux récapitulatif des DAA actuellement utilisés dans le traitement du VHC. Adapté d'après (Horsley-Silva and Vargas 2017).....	39
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des anticorps utilisés en FACS, IF et WB.....	87
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour la génération du plasmide donneur TagRFP-CLDN1.....	87
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour la génération du plasmide donneur EGFP-OCLN.....	88
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour la PCR quantitative	92
Tableau 6 : Traitement des lignées cellulaires avant imagerie en temps réel	93

Liste des figures

Figure 1 : Nombre d'infections par le VHC par pays fin 2015.....	19
Figure 2 : Prévalence des différents génotypes du VHC en fonction des régions GBD « Global burden of disease ».....	20
Figure 3 : Evolution de l'infection par le VHC chez les patients.....	22
Figure 4 : Réponse immunitaire en réponse à l'infection par le VHC.	26
Figure 5 : Réponse immunitaire innée induite à la détection du VHC au sein des hépatocytes.	28
Figure 6 : Contre-mesure du VHC face au système immunitaire	31
Figure 7 : Profil des marqueurs d'infection par le VHC dans le cas d'une infection aigüe résolutive et celui d'une infection chronique	35
Figure 8 : Progression du traitement contre le VHC.	37
Figure 9 : Arbre phylogénétique du VHC contenant l'ensemble des génotypes (GT) 1 à 8 et les sous-types qui leur sont associés (Borgia et al. 2018).	42
Figure 10 : Structure schématique de la lipo-viro-particule	43
Figure 11 : Organisation génomique du VHC	45
Figure 12 : Organisation de la séquence codante du VHC codant pour une polyprotéine virale	46
Figure 13 : Représentation schématique de la protéine core.....	46
Figure 14 : Représentation schématique des glycoprotéines enveloppes E1 et E2 .	48
Figure 15 : Représentation schématique de la viroporine p7.....	49
Figure 16 : Représentation schématique de la protéase NS2	50
Figure 17 : Représentation schématique du complexe NS3-4A.....	50
Figure 18 : Représentation schématique de NS4B.....	51
Figure 19 : Représentation schématique de NS5A.....	52
Figure 20 : Représentation schématique de NS5B.....	53
Figure 21 : Traduction IRES dépendante du génome du VHC.....	55
Figure 22 : Représentation schématique des sites de clivages de la poly-protéines virales du VHC.	57
Figure 23 : Modèle schématique d'une usine virale et des protéines formant le complexe de réplication.....	58
Figure 24 : Modèle schématique la production des lipo-viro-particules de VHC.	59

Figure 25 : Schématisation des stratégies d'entrée virale	67
Figure 26 : Schématisation des stratégies d'entrée virale	68
Figure 27 : Les différents facteurs d'entrée du VHC.....	70
Figure 28 : Schématisation simplifiée du complexe jonctionnel et des jonctions serrées.	75
Figure 29 : Schématisation l'OCLN humaine associée à une membrane plasmique.	76
Figure 30 : Schématisation des différentes stratégies d'interactions VHC-OCLN/CLDN1 actuellement controversées.	81
Figure 31 : Schématisation de l'entrée virale du VHC.....	83
Figure 32 : Principe de la quantification semi-automatisé de la proportion de particules OCLN-positive et de leur localisation.....	95
Figure 33 : Génération des lignées Huh 7.5.1 TagRFP-CLDN1 ^{+/+} et EGFP-OCLN ^{+/+} par ingénierie CRISPR/Cas 9.....	103
Figure 34 : Expression de la TagRFP dans les différentes populations de cellules éditées.....	104
Figure 35 : Validation de l'insertion de l'étiquette dans le génome des cellules éditées.....	105
Figure 36 : Vérification de l'expression des protéines de fusion dans les lignées Huh 7.5.1 TagRFP-CLDN1 ^{+/+} et EGFP-OCLN ^{+/+}	106
Figure 37 : Vérification du taux d'expression des protéines de fusion dans les lignées Huh 7.5.1 TagRFP-CLDN1 ^{+/+} et EGFP-OCLN ^{+/+}	107
Figure 38 : Distribution cellulaire de la Tag-RFP et de l'EGFP-OCLN dans les lignées cellulaires éditées.....	109
Figure 39 : Perméabilité des monocouches cellulaires de lignées TagRFP-CLDN1 ^{+/+} et EGFP-OCLN ^{+/+}	110
Figure 40 : Diffusion relative de la TagRFP-CLDN1 et de l'EGFP-OCLN des lignées cellulaires éditées.....	111
Figure 41 : Génération de lignées sauvage et EGFP-OCLN ^{+/+} invalidées génétiquement pour CLDN1.....	113
Figure 42 : Caractérisation fonctionnelle des lignées sauvages et EGFP-OCLN ^{+/+} invalidées génétiquement pour CLDN1.....	114
Figure 43 : Génération de particules de VHC fluorescentes.....	115

Figure 44 : Schéma du mécanisme d'action des souches virales rapportrices utilisées	117
Figure 45 : Permissivité au VHC des lignées TagRFP-CLDN1 ^{+/+} et EGFP-OCLN ^{+/+} générées.....	118
Figure 46 : Expression relative des récepteurs du VHC dans les lignées éditées TagRFP-CLDN1 ^{+/+} et EGFP-OCLN ^{+/+}	119
Figure 47 : Permissivité des lignées KO générées aux VHC	120
Figure 49 : Localisation de l'interaction HCV-OCLN et microsphere-OCLN.....	122
Figure 50 : Quantification des particules de VHC et des microsphères OCLN-positive au cours du temps et de leur localisation aux TJs ou hors des TJs.....	123
Figure 51 : Cinétique d'infection du VHC.....	124
Figure 52 : Quantification des microsphères OCLN-positive au cours du temps et de leur localisation aux TJs ou hors des TJs.....	124
Figure 53 : Imagerie en temps réel de l'association VHC-OCLN	125
Figure 54 : Dynamique des particules de VHC en fonction de la quantité relative d'EGFP-OCLN associé.....	126

Liste des annexes

Annexe 1 : Camille M.H. Clément, Cristina M. Dorobantu, Maika S. Deffieu, Philippe Ronde, Thomas F. Baumert, Yves Mély, Nilda Vanesa Ayala-Nunez, Raphael Gaudin. « Bioengineering of hepatocellular carcinoma reporter cells using CRISPR/Cas9-based tagging of endogenous Claudin-1 » en revision dans *Biology of the Cell*.....172

Annexe 2 : Camille M.H Clément, Cristina M. Dorobantu, Nilda Vanesa Ayala-Nunez, Philippe Rondé, Thomas F. Baumert, Yves Mély, Vincent Lucansky, Raphael Gaudin. « Occludin slows down Hepatitis C virus particle dynamics outside the tight junctions » soumis dans *PLOS Pathogens*.197

Liste des abréviations

aa : acide aminée
Ab : antibody (anticorps)
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ALAT : alanine transaminase
ARN : acide ribonucléique
ARNdb : acide ribonucléique double brin
ARNm : ARN messenger
ARNsb : acide ribonucléique simple brin
BOC : Boceprevir
CLDN : Claudin
CLDN1 : Claudin-1
cLDs : gouttelettes lipidiques cytosolique
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CPV : parvovirus canin
CRISPR : clustered regulary interspaced short palindromic repeats
CV-B : Cocksackie B
Cyp B : Cyclophilin B
CypA : Cyclophilin A
DAA : direct-acting antiviral (agents antiviraux à action direct)
DENV : virus de la dengue
DO : densité optique
EGFR : l'epidermal growth factor receptor
EMCV : virus de l'encéphalomyocardite
Eph2A : Ephrin type A receptor 2
FACS : fluorescent-activated cell sorting (Cytométrie en flux)
FBS : fetal bovin seum (sérum de veau fœtal)
FDA : Food and Drug Administration
FRAP : fluorescence recovery after photobleaching (Récupération de fluorescence après photoblanchiment)
HCC : hépatocarcinome
HCVcc : cell culture HCV (VHC)
HCVpp : pseudoparticule HCV (VHC)
HDL : high density lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)
HSPG : protéoglycanes d'héparane sulfate
HTA : host-trageting agent (agent anti-viraux ciblant l'hôte)
HVR : région hypervariable
IAV : virus de la grippe A
IF : Immunofluorescence
IFN : Interférons
IL : Interleukine

IRES : Internal ribosome entry site (site d'entrée interne du ribosome)
 IRF : Interferon regulatory factor (facteur régulateur de l'interféron)
 ISGs : Interferon stimulates genes (gènes stimuler par les interférons)
 JAK/STAT : Janus kinase / Signal transducers and activators of transcription
 JFH1 : Japanese fulminante hepatitis 1 (souche virale de l'hépatite fulminante)
 KI : knock-in (insertion dans le génome)
 KO : knock-out (invalidation génique)
 LDL : low density lipoprotein (lipoprotéine de basse densité)
 LDL-R : Low density lipoprotein receptor
 LT : Lymphocytes T
 LVP : lipo-viro-particule
 MAVS : Mitochondrial antiviral-signaling protein
 MDA5 : melanoma differentiation-associated gene 5
 miR : micro-ARN
 MW : molecular weight (poids moléculaire)
 NANBH : non-A non-B hepatitis (hépatite non-A, non B)
 NF- κ B : nuclear factor κ B (facteur nucléaire κ B)
 NHS-ester : N-Hydroxysuccinimid-ester
 OCLN : Occludin
 ORF : Open reading frame (cadre de lecture ouvert)
 PAM : protospacer adjacent motif
 PAMPs : pathogen-associated molecular patterns (motifs moléculaires associés aux agents pathogènes)
 PCR : polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
 PKR: protéine kinase R
 PRRs : pattern-recognition receptors (récepteurs de reconnaissance de motifs)
 RdRp : RNA-dependent RNA polymerase (ARN polymérase ARN dépendante)
 RE : Réticulum endoplasmique
 RIG-I : retinoic acid-inducible gene I
 RLRs : retinoic acid-inducible gene I-like receptors (Récepteurs de type RIG-I)
 RLU :
 RVP : Réponse virologique prolongé
 SR-B1 : Scavenger-receptor Type B class I
 TEER : trans-epithelial electrical resistance (résistance électrique trans-épithéliale)
 TJAPs : tight-junction associated protein (protéines associées aux junction serrées)
 TJs : Tight junction (Jonctions serrées)
 TLR : toll-like receptors (récepteurs de type Toll)
 TLR-3 : Toll-like receptor 3
 Treg : Cellule T régulatrice
 TVR : Telaprevir
 UTR: untranslated region (region non traduite)
 VHC : virus de l'hépatite C
 VIH : virus de l'immunodéficience humaine WB : Western blot

ZO : zonula occludens

Introduction

I. Généralités sur le VHC

1. Découverte du VHC

Au début des années 70, l'ensemble des hépatites viro-induites était associé aux virus de l'hépatite A et B, au cytomégalovirus ainsi qu'au virus d'Epstein-Barr. Cependant, des cas cliniques d'hépatite développée suite à une chirurgie et/ou transfusion de sang ont été rapportés comme non-associés à ces virus (Knodell et al. 1975 ; Feinstone et al. 1975). Le Dr. Feinstone parle alors d'un nouvel agent responsable de ces cas cliniques qu'il nomme hépatite non-A, non-B (NANBH pour *non-A non-B hepatitis*) (Feinstone et al. 1975).

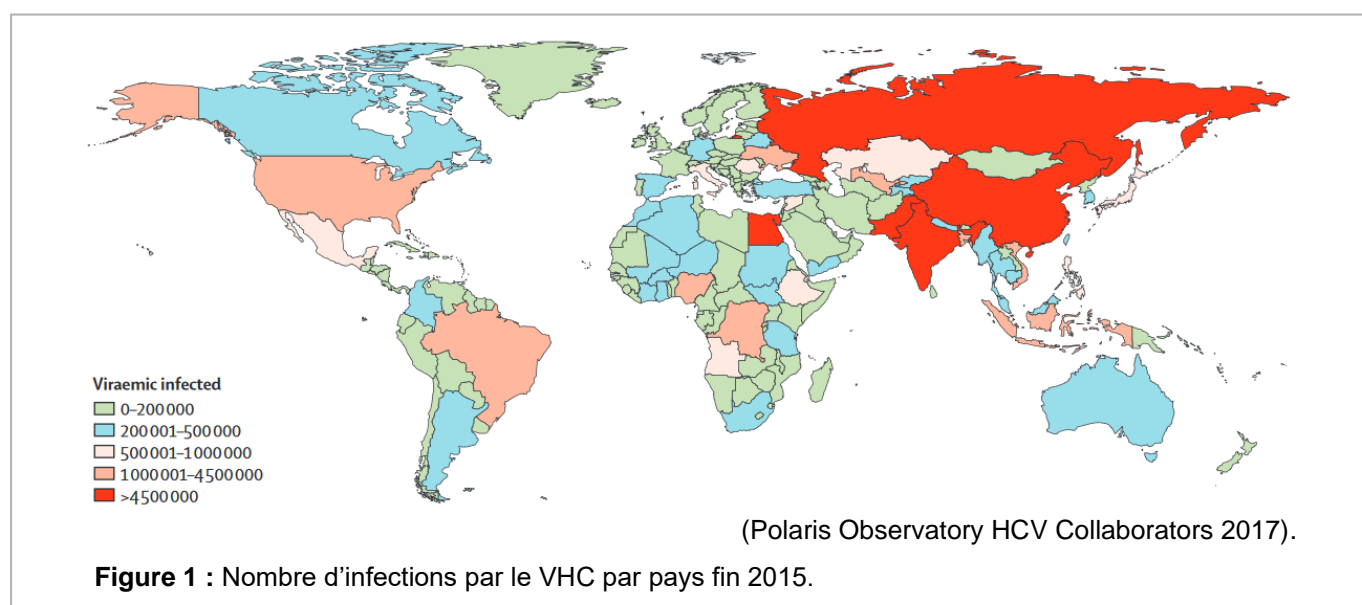
Dans les années qui ont suivi, de nombreuses études se sont succédées afin de caractériser et comprendre l'agent responsable du NANBH. Des études sur des chimpanzés ont montré que le NANBH est provoqué par un agent pathogène transmissible par le sang (H. J. Alter et al. 1978). De plus, l'observation d'hépatocytes de chimpanzés présentant une NANBH a révélé la formation et l'accumulation de structures tubulaires anormales (Y. K. Shimizu et al. 1979). La filtration de sérum de patients infectés a permis de déterminer la taille de l'agent pathogène entre 30 et 50 nm (D. W. Bradley et al. 1985 ; He et al. 1987).

En 1989, le criblage d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) obtenu à partir de sérum de patient entraîne l'identification de l'agent responsable de la NANBH. Il est alors nommé virus de l'hépatite C (VHC) (Choo et al. 1989). La présence d'anticorps anti-VHC dans le sérum de patient atteint de NANBH a pu alors être confirmé (Kuo et al. 1989) permettant le développement des premiers tests diagnostiques pour diminuer les cas de transmission par transfusion sanguine.

2. Epidémiologie du VHC

Le VHC est depuis son identification en 1989 un problème de santé publique majeur. En effet, l'infection chronique par le VHC entraîne à terme le développement de lésions du foie tel que la fibrose, la cirrhose et l'hépatocarcinome (*hepatocarcinoma* : HCC). L'HCC représente l'un des cancers les plus agressifs avec 700 000 morts estimés en 2012 (Ferlay et al. 2015 ; Torre et al. 2015). Dans son rapport l'organisation mondiale de la santé estime à 71 millions le nombre de personnes vivant avec le VHC au sein de la population mondiale en 2015 avec 1.75 million de nouveaux cas cette même année (WHO Global hepatitis report, 2017).

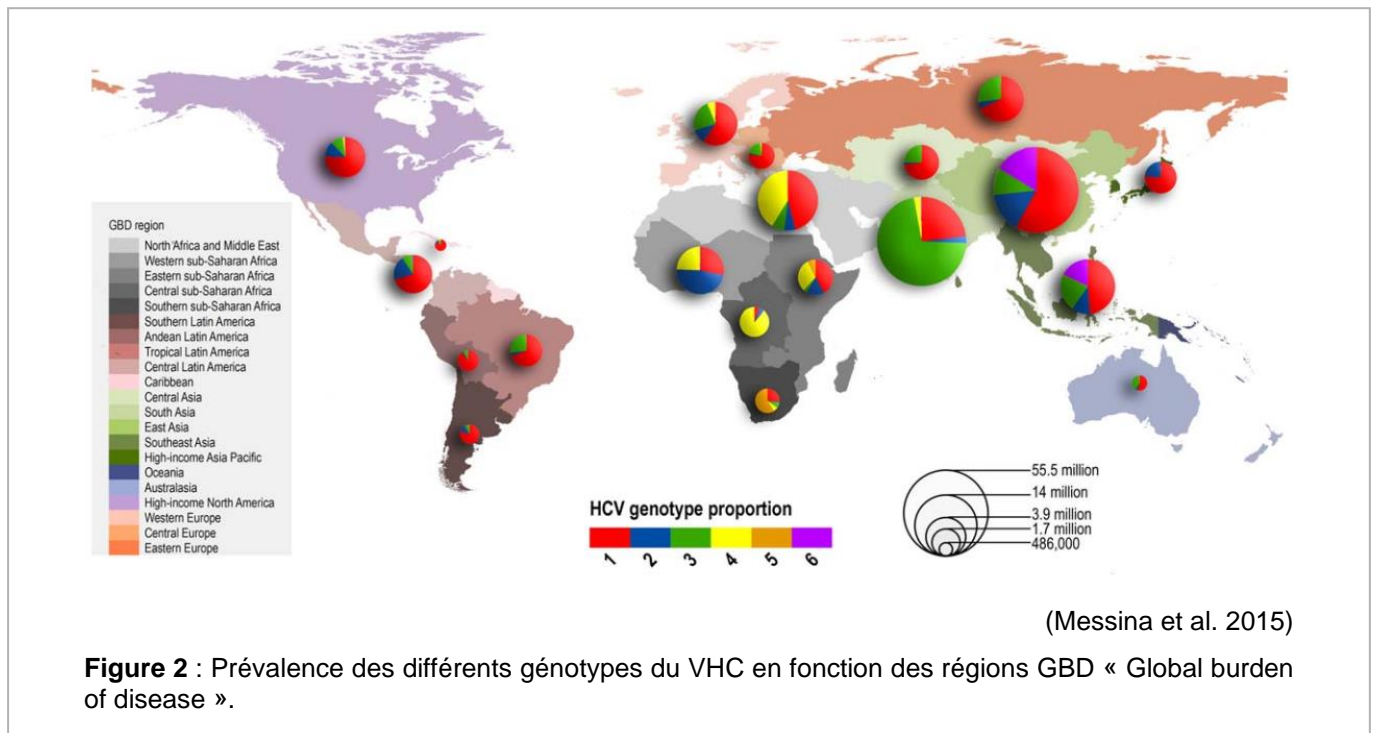
D'un point de vue mondial, la prévalence virémique globale du VHC est estimée à 1%. La Chine, le Pakistan, l'Inde, l'Égypte et la Russie sont les pays présentant le plus fort taux d'infection (Figure 1) (Polaris Observatory HCV Collaborators 2017).



Le VHC présente une diversité génétique importante, il est classé en 8 génotypes (1 à 8) basés sur la phylogénie et l'analyse de séquences virales, qui sont eux même divisés en plusieurs sous-types (P. Simmonds et al. 1994 ; Smith et al. 2014 ; Borgia et al. 2018).

La répartition géographique de ces génotypes est variable, le génotype le plus représenté est le génotype 1 à 46.2 %, il est majoritairement localisé en Asie de l'Est et représente 1/3 des génotypes présents en Asie. Le génotype 3 est retrouvé à 30.1%, il représente les 3/4 de l'ensemble des génotypes présents en Asie du Sud. Les génotypes 2, 4 et 6 sont responsables du reste des cas mondiaux à respectivement 9.1 %, 8.3 % et 5.4 % (Figure 2) (Messina et al. 2015).

A l'échelle mondiale le nombre total d'infection par le VHC tend à diminuer depuis 2007 dû au développement de tests de dépistage sanguin et de virothérapie début des années 1990 (Polaris Observatory HCV Collaborators 2017).



3. Mode de transmission du VHC

Le mode de transmission du VHC est majoritairement parentéral, la contamination se fait par contact direct avec du sang infecté ou du matériel souillé par celui-ci. Avant l'identification du VHC et le développement de tests de dépistage, la transmission se faisait par le biais de transfusions sanguines ou l'injection de produits dérivés du sang (Zou et al. 2010). Cette voie de contamination est devenue quasi-nulle mais elle reste tout de même importante dans les pays en développement ne pratiquant pas de dépistage préalable des poches de sang.

Dans les pays industrialisés c'est la consommation de drogue par voie intraveineuse qui est devenue la voie principale de transmission notamment via le partage des accessoires, des cotons et la réutilisation d'aiguilles (Thorpe et al. 2002).

Des études ont révélé l'existence d'une transmission verticale (de la mère à l'enfant) de l'ordre de 4-7% si la mère présente un taux élevé d'acide ribonucléique (ARN) viral dans le sang (M. J. Alter 2007). Ce risque de transmission augmente si la mère est co-infectée avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Tovo et al. 1997). Le risque d'une transmission lors de l'allaitement est quant à lui nul (H. H. Lin et al. 1995).

D'autres études ont mis en évidence la présence de VHC dans le sperme (Leruez-Ville et al. 2000) soulevant une possibilité de transmission par voie sexuelle. Cette éventualité a été démontrée comme rare et majoritairement restreinte aux pratiques sexuelles brutales, aux relations avec de multiples partenaires et aux hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (Terrault et al. 2013). Le risque de transmission est d'autant plus important dans le cas de co-infection par le VIH. (Danta et al. 2007 ; van de Laar et al. 2009).

II. Histoire naturelle du VHC

Le foie est un organe représentant 2 à 3% de la masse corporelle totale du corps humain. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions : métaboliques, d'excrétion et d'immunité (Corless and Middleton 1983). Son intégrité peut être compromise notamment par des infections virales telles que celle par le VHC conduisant à une hépatite (Choo et al. 1989). Ces hépatites peuvent être bénignes et ne durer que quelques semaines ou évoluer en une forme plus grave s'installant à vie. Suite à une infection par le VHC les patients développeront une phase aiguë qui dans 30% des cas sera résolutive et dans 70% évoluera vers une hépatite chronique avec un risque de développement de cirrhose de 20-30% sur une période de 30 ans (Figure 3). En 2016, l'OMS estime que 399 000 personnes sont mortes de l'hépatite le plus souvent due à une cirrhose ou un HCC.

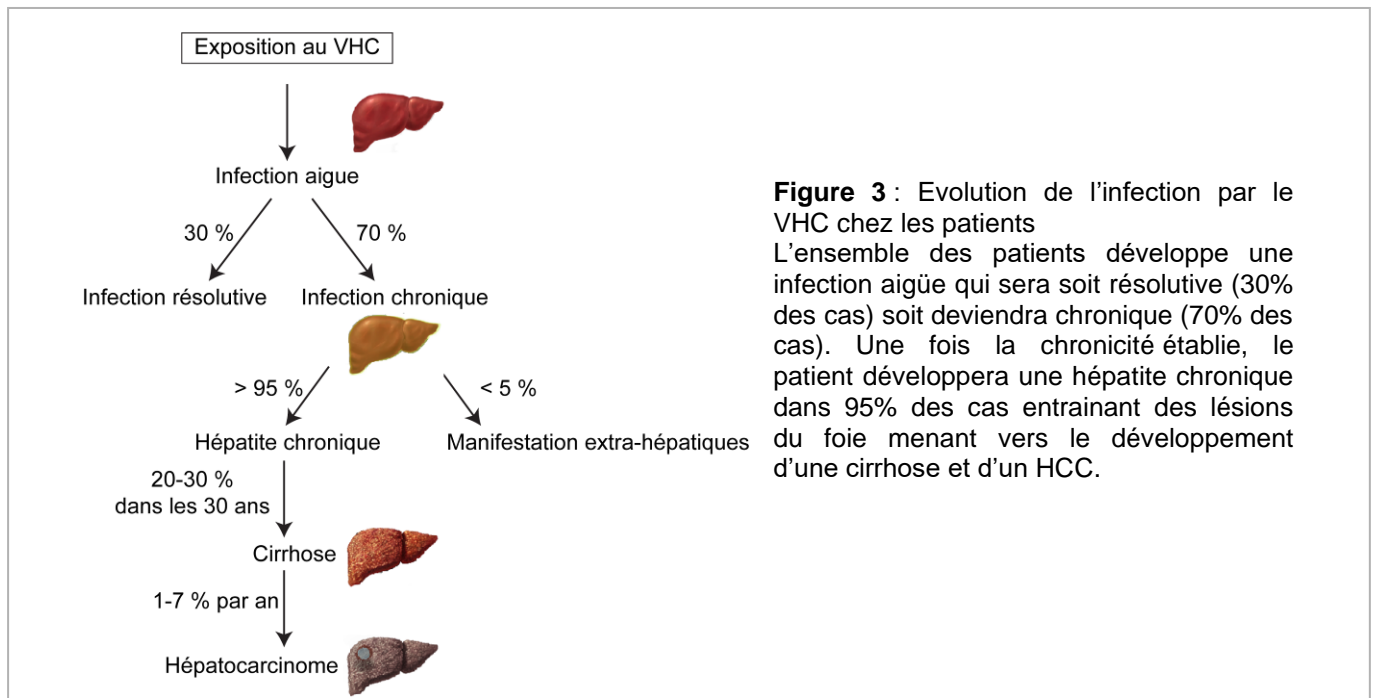


Figure 3 : Evolution de l'infection par le VHC chez les patients
L'ensemble des patients développe une infection aiguë qui sera soit résolutive (30% des cas) soit deviendra chronique (70% des cas). Une fois la chronicité établie, le patient développera une hépatite chronique dans 95% des cas entraînant des lésions du foie menant vers le développement d'une cirrhose et d'un HCC.

1. Infection aiguë

Le temps d'incubation de la phase aiguë est d'environ 7 semaines (4-20 semaines selon les individus), la présence de symptômes va concerner uniquement un tiers des patients. Ces symptômes seront variables et souvent similaires à ceux développés lors de nombreuses infections virales : fièvre, fatigue, manque d'appétit,

nausées, vomissements, douleurs articulaires. D'autres symptômes plus caractéristiques d'une hépatite peuvent aussi survenir mais ils sont plus rares : jaunisse, coloration sombre des urines, coloration grisâtre des selles ou encore des douleurs abdominales (Harvey J. Alter et al. 1989; J. H. Hoofnagle 1997).

Seuls quelques cas d'hépatites fulminantes associées au VHC ont été reportés, notamment celles associées à la souche de VHC « Japanese fulminante hepatitis 1 » (JFH1) (T. Kato et al. 2001).

Cette phase pouvant être asymptomatique ou passer complètement inaperçue se révèle extrêmement compliquée à étudier. Dans les études réalisées, il est décrit qu'entre 30% des individus vont éliminer le virus naturellement (Figure 3) (Westbrook and Dusheiko 2014). Cette élimination spontanée du VHC par le patient est appelée infection résolutive. Elle a été associée à différents facteurs de l'hôte. Tout d'abord à des facteurs génétiques incluant l'allèle DQB1*0301 du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Alric et al. 1997), ainsi qu'un polymorphisme en amont du gène codant pour ILB28b (Thomas et al. 2009). D'autres études ont montré que les individus jeunes et les femmes présentent une meilleure élimination du virus (Yeung et al. 2007 ; Grebely et al. 2014). Pour finir, il a été montré qu'une apparition rapide d'anticorps neutralisant anti-VHC augmente les chances d'élimination du VHC (Osburn et al. 2014).

Dans le cas d'absence d'élimination du virus, le patient développera la forme chronique de l'infection.

2. Infection chronique

Dans la majorité des cas, l'infection aiguë va déboucher sur une forme chronique de l'infection. L'hépatite chronique va évoluer sur plusieurs années et en plusieurs étapes. L'évolution étant silencieuse, les patients sont généralement diagnostiqués uniquement lors de complications hépatiques graves. La phase chronique correspond à une persistance d'un taux élevé d'ARN du VHC et d'alanine transaminase (ALAT) (Barrera et al. 1995).

Le premier stade d'évolution de la maladie est la fibrose, il s'agit de l'apparition de dommage chronique du foie conjugué à l'accumulation excessive de matrice extracellulaire (collagène, lamine, élastine, fibronectine, ...). Les lésions hépatiques générées par l'infection vont conduire à la régénération des cellules

parenchymateuses et le remplacement des cellules nécrotiques ou apoptotiques accompagnées d'une réponse inflammatoire entraînant un dépôt limité de matrice extracellulaire. Lors de l'infection chronique cette régénération du foie échoue et les hépatocytes sont remplacés par de la matrice extracellulaire. L'inflammation suractive les cellules stellaires hépatiques qui vont produire de la matrice extracellulaire en abondance et entraîner une accumulation du tissu cicatriciel fibroblastique (Bataller and Brenner 2005; Sebastiani, Gkouvatsos, and Pantopoulos 2014).

Le second stade d'évolution de l'infection chronique est la cirrhose c'est un stade avancé de la fibrose hépatique et elle va concerner 20 à 30% des patients dans les 20-30 ans après l'infection (Figure 3) (T. Poynard, Bedossa, and Opolon 1997). Il s'agit de l'isolation des tissus lésés par des septas fibreux donnant alors des nodules de régénération. Les conséquences cliniques sont l'altération de la fonction hépatocytaire et l'augmentation de la résistance intrahépatique (Schuppan and Afdhal 2008). L'installation de la cirrhose va conduire à l'apparition de symptômes hépatiques : fatigue, faiblesse musculaire, rétention de fluide, jaunisse, urine noirâtre et des démangeaisons (J. H. Hoofnagle 1997). De plus la cirrhose augmente les risques de développement d'HCC de 1-7% par an (Figure 3), c'est la deuxième cause de décès liée au cancer dans le monde (Goossens and Hoshida 2015).

3. Manifestation extra-hépatiques

Dès les années 1990 le VHC a été associé à des manifestations extra-hépatiques (Cacoub et al. 1999). Elles peuvent être liées à une sur-activation du système immunitaire et du système inflammatoire.

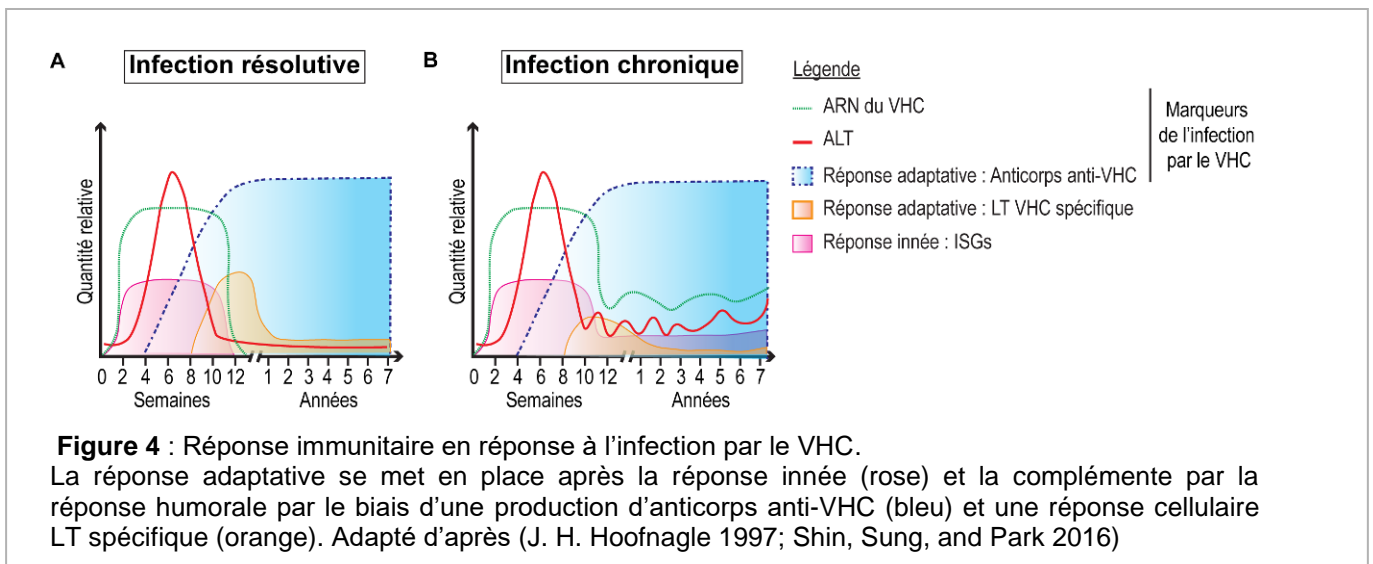
Parmi ces manifestations, on trouve la cryoglobulinémie mixte qui est causée par la présence de cryoglobulines (immunoglobuline précipitant à des températures inférieures à 37°C) dans le sérum. Ces cyroglobulines sont produites lors de la réponse immunitaire contre le VHC entraînant une lymphoprolifération bénigne qui peut évoluer vers un syndrome lymphoprolifératif agressif (Cacoub et al. 2016). Le lymphotropisme s'accorde avec la détection de VHC dans les cellules mononuclées du sang (Zignego et al. 1992) et a été confirmé *in vivo* et *in vitro* (Sung et al. 2003).

Les manifestations cliniques sont diverses et peuvent toucher la peau (purpura, ulcère cutané chronique, ...), le système nerveux (axonopathie sensorielle, mononévrite multiple), ou encore les reins (glomérulonéphrite) (Cacoub et al. 2016).

Le développement de troubles neurologiques et psychiatriques avec des symptômes impactant la qualité de vie des patients : fatigue, dépression, dysfonctionnement cognitif ont aussi été associés au VHC (Yarlott, Heald, and Forton 2017). Le VHC serait capable d'infecter les cellules de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et ainsi entraîner une perméabilisation de la BHE (Fletcher et al. 2010; 2012). Une étude post-mortem sur des cerveaux de patients atteints d'hépatite chronique a montré que le VHC est un facteur de risque dans le développement d'une artériosclérose (Morgello et al. 2014).

III. Réponse immunitaire contre le VHC

L'organisme possède deux lignes de défense contre les pathogènes : l'immunité innée et l'immunité acquise. Ensemble, elles permettent la reconnaissance des éléments étrangers et la mise en place d'une réponse immunitaire adaptée pour les éliminer. Lors d'une infection par le VHC ces réponses immunitaires vont être déterminantes dans la persistance du VHC dans l'organisme. Seule une réponse efficace de l'organisme permettra l'élimination du VHC conduisant à une infection résolutive, au contraire une réponse inefficace va entraîner la chronicité de l'infection (Figure 4).



1. Réponse immunitaire innée

Les cellules de l'organismes sont capables de reconnaître des motifs viraux spécifiques, les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs). Ces motifs sont reconnus par des senseurs membranaires et cytoplasmiques, les récepteurs de reconnaissance de motifs (pattern-recognition receptors : PRRs). Ces PRRs vont pouvoir reconnaître des PAMPs tels que l'ADN génomique, l'ARN simple brin et double brin (ARNsb et ARNdb), l'ARN 5'-triphosphate et les protéines virales présents dans la cellule. Trois classes de PRRs ont été décrites comme spécifiques de la détection virale : les récepteurs de type Toll (Toll-like receptors : TLRs), les récepteurs de type RIG-I

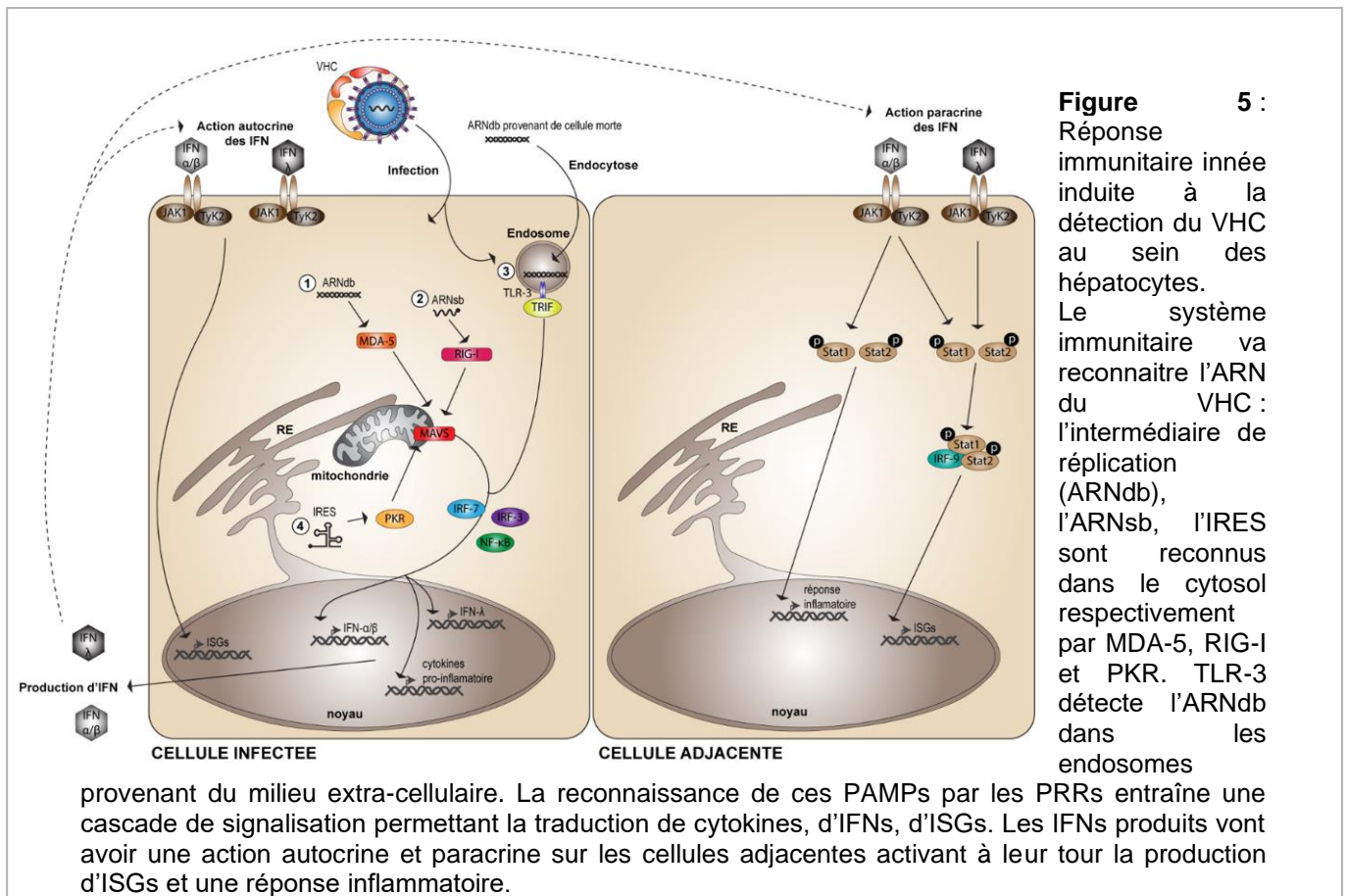
(Retinoic acid-inducible gene I-like receptors : RLRs) et les récepteurs de type NOD (NOD-like receptors).

Les RLRs détectent l'ARN cytosolique du VHC dans les cellules infectées. La protéine RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) reconnaît préférentiellement les séquences d'ARN marquées un 5' tri-phosphate contenant des motifs poly-U/UC (Sumpter et al. 2005 ; Hornung et al. 2006). La reconnaissance du PAMPs active un changement de conformation de RIG-I qui expose son domaine CARD (domaine de recrutement de caspase) permettant son interaction avec *Mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS) au niveau des membranes externes des mitochondries. L'interaction RIG-I/MAVS engendre l'activation de deux facteurs de transcription : les facteurs régulateurs de l'interféron 3 et 7 (IRF-3 et IRF-7), ainsi que le facteur nucléaire κ B (NF- κ B) (Seth et al. 2005). Ils vont permettre la production d'interférons (IFN) : de type I (IFN- α et IFN- β) et de type III (IFN- λ) et de cytokines pro-inflammatoires. Les IFN sécrétés vont se lier à des récepteurs nommés *IFN- α receptor* permettant la stimulation autocrine et paracrine de la voie de signalisation JAK/STAT (Janus kinase / Signal transducers and activators of transcription). L'activation de la voie JAK/STAT entraîne la transcription de nombreux gènes stimulés par les interférons (ISGs) afin de contrôler l'infection et d'induire l'état antiviral (Horner and Gale 2013) (Figure 5).

Un autre RLR, melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), a été montré comme capable de reconnaître l'ARN du VHC, plus particulièrement sa forme répliquative en ARNdb. MDA5, comme RIG-I, possède un domaine CARD qui, en interagissant avec MAVS, induit une réponse interféron (Cao et al. 2015). Ces deux détecteurs, RIG-I et MDA5 agissent de manière séquentielle, la réponse IFN médiée par RIG-I domine en début d'infection alors que celle médiée par MDA5 est plus tardive (Hiet et al. 2015) (Figure 5).

La protéine kinase R (PKR) participe aussi à la détection précoce du VHC, c'est un senseur d'ARNdb (Robertson and Mathews 1996). Le ligand de PKR est l'IRES présente dans l'extrémité 5'UTR du génome du VHC (Arnaud et al. 2010 ; 2011). PKR va inhiber la réponse antivirale en phosphorylant un facteur d'initiation

de la synthèse protéique, eIF2 α , inhibant ainsi l'initiation de la synthèse protéique de l'hôte, notamment celle des facteurs antiviraux (Chong et al. 1992). Seule la traduction des ARN messagers (ARNm) de la cellule est touchée, le VHC y est insensible (Koev, Duncan, and Lai 2002). La liaison de PKR au VHC active aussi une cascade de signalisation entraînant l'induction d'ISGs et la production d'IFN- β par la voie MAVS/IRF-3 (Arnaud et al. 2011) (Figure 5).



Le TLR 3 est aussi impliqué dans la détection du VHC, c'est un senseur d'ARNdb dans les endosomes. Les signaux TLR3 sont transmis dans la cellule par la protéine adaptatrice TRIF (TIR-domain-containing adaptator-inducing interferon- β) qui active IRF-3 et NF- κ B menant à la production d'IFN de type I, de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (Takeuchi and Akira 2009). Dans le cas du VHC, le ligand de TLR3 a été identifié comme l'ARNdb correspondant à son intermédiaire de réplication (Figure 5). Celui-ci s'accumule tardivement au cours du cycle viral, d'où une activation tardive de TLR3 (3-4 jours après l'infection) (K. Li et al. 2012). De plus l'activation de TLR3 dans les cellules peut aussi avoir lieu par absorption de d'ARNdb du VHC extracellulaire (provenant de cellules mourantes ou du milieu

extracellulaire) via les récepteurs scavenger (Dansako et al. 2013) (Figure 5). L'action de TLR3 fonctionne comme un système de détection secondaire du système immunitaire inné intervenant après la détection initiale du VHC par RIG-I.

Il a été rapporté que l'induction de l'état antiviral et les réponses pro-inflammatoires de TLR3 et RIG-I pourraient contribuer à la pathogenèse du VHC, comprenant l'inflammation du foie et la progression en fibrose au cours de l'infection chronique, bien que les mécanismes restent inconnus (Horner and Gale 2013).

2. Réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire innée peut limiter la réplication du VHC et sa dissémination, mais elle permet rarement une élimination immédiate de l'infection sans l'action du système immunitaire adaptatif. La réponse adaptative à l'infection par le VHC est caractérisée par deux réponses : la réponse humorale et la réponse cellulaire.

La réponse humorale consiste en la production d'un large spectre d'anticorps dirigé contre les épitopes du VHC (Figure 4). Cependant, la plupart d'entre eux n'ont pas d'activité antivirale pertinente et seule une petite fraction d'anticorps est capable d'inhiber la liaison et l'entrée du VHC. Ces anticorps sont appelés «anticorps neutralisants» (Logvinoff et al. 2004). La majorité de ces anticorps est dirigée contre les glycoprotéines E1 et E2 (Edwards et al. 2012). Leur rôle protecteur contre l'infection a été mis en évidence pour la première fois chez le chimpanzé (Farci et al. 1991 ; Pestka et al. 2007). Cependant la présence d'anticorps seule n'est pas suffisante pour permettre l'élimination du virus (Logvinoff et al. 2004) et nécessite le soutien d'une seconde réponse adaptative (Figure 4).

Il s'agit de la réponse cellulaire, elle se met en place au cours de la phase aiguë de l'infection et se caractérise par une forte réponse des lymphocytes T (LT) avec une diminution de la charge virale, notamment chez les patients résolvant l'infection, (Lechner et al. 2000 ; Thimme et al. 2001) (Figure 4). Ces données ont été confirmées par l'observation d'une corrélation entre l'augmentation de l'expression d'IFN- γ et la diminution du titre viral lors de la phase d'infection aiguë chez les chimpanzés (Shin et al. 2006). De plus, des chimpanzés déplétés de LT_{CD4}⁺ ou LT_{CD8}⁺ ne sont plus en mesure d'éliminer le virus (Arash Grakoui et al. 2003;

Shoukry et al. 2003). Parmi les LT impliqués dans la réponse contre le VHC les acteurs principaux sont LT_{CD8^+} , ils vont contrôler l'infection. Les LT_{CD4^+} quant à eux servent de support permettant de prévenir l'apparition de résistance du VHC contre les LT_{CD8^+} .

Les LT_{CD4^+} reconnaissent les antigènes viraux présentés par le CMH de classe II (Day et al. 2002 ; Schulze zur Wiesch et al. 2005) entraînant la production d'Interleukines (IL) (Kared et al. 2013).

Les LT_{CD8^+} sont détectés dans le sang périphérique 6 à 8 semaines après l'infection corrélant avec : la hausse des enzymes hépatiques tel que l'ALT (indication de la mort d'hépatocytes), l'apparition de symptômes cliniques et une forte diminution de la charge virale (Lechner et al. 2000 ; Thimme et al. 2001 ; Cox, Mosbrugger, et al. 2005). Les LT_{CD8^+} reconnaissent les antigènes viraux présentés par le CMH de classe I (Schmidt, Thimme, and Neumann-Haefelin 2011) activant la réponse antivirale par deux modes d'actions : cytolytique ou non cytolytique. La voie cytolytique consiste à tuer directement les cellules infectées, cette cytotoxicité va être médiée par des récepteurs FAS et son ligand FAS-L ou par la sécrétion paracrine de perforines. La voie non cytolytique entraîne la sécrétion de cytokines antivirales par les LT_{CD8^+} : IFN- γ et le *tumor necrosis factor alpha*. C'est la voie non cytolytique qui est utilisée par les LT_{CD8^+} face au VHC (Jo et al. 2009), malgré la mise en évidence *in vitro* d'une sensibilité à la cytolysse pour les cellules porteuses du réplicon du VHC. Il s'avère que des patients infectés par le VHC présentent des LT_{CD8^+} ne sécrétant qu'une faible quantité de perforine, suggérant le rôle mineur de la voie cytolytique dans l'infection naturelle par le VHC (Jo et al. 2012).

3. Contre-attaque du VHC face au système immunitaire

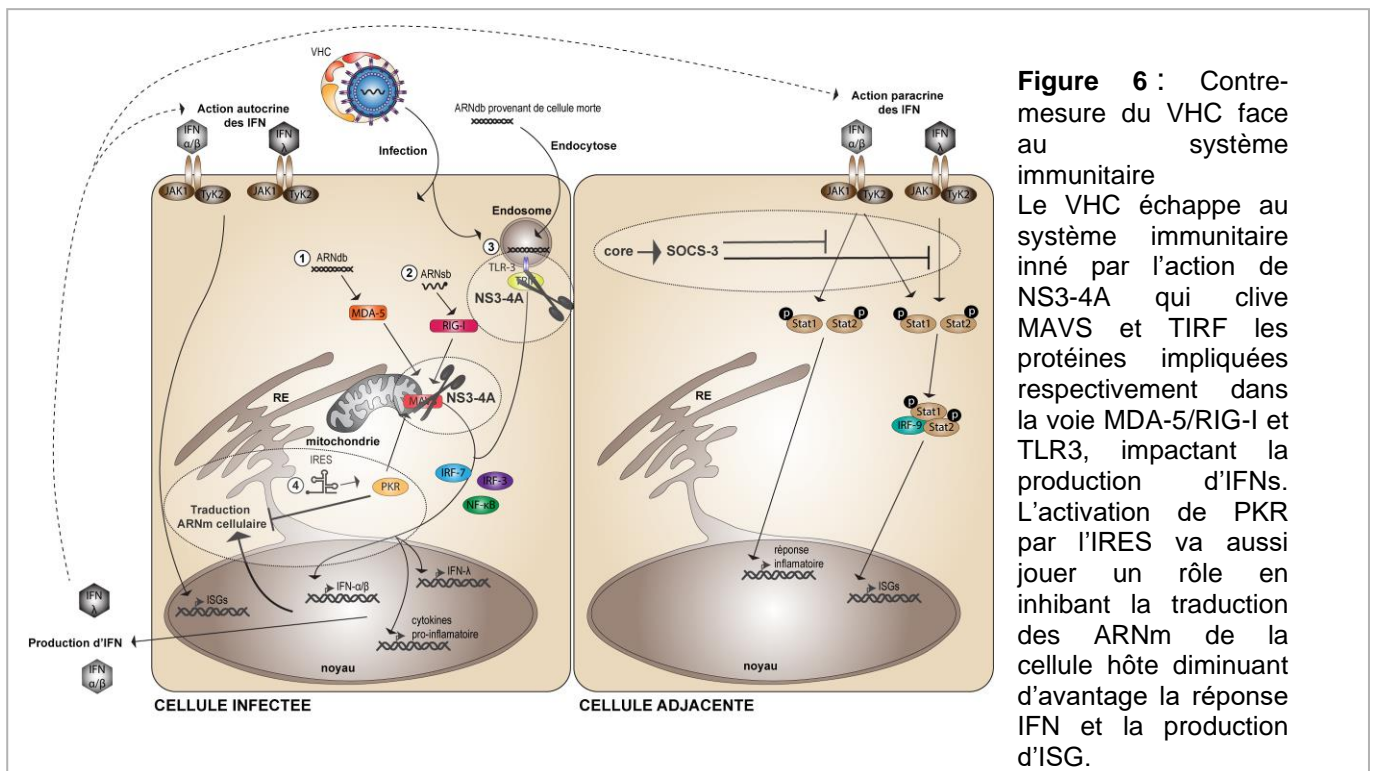
La fréquence d'établissement d'une infection chronique chez les patients s'explique par la capacité de VHC à échapper au système immunitaire inné et adaptatif.

a) Echappement au système immunitaire inné

C'est la protéine non structurale NS3-4A qui est au centre de cette contre-attaque contre le système immunitaire inné. Tout d'abord elle peut bloquer la cascade de signalisation enclenchée par RIG-I, par le clivage de MAVS (Foy et al. 2005 ; X.-D. Li et al. 2005 ; Baril et al. 2009), abrogeant ainsi la production d'IFN et favorisant l'installation d'un état chronique de l'infection. NS3-4A a une seconde cible protéolytique, il s'agit de TIRF, la protéine adaptatrice de la signalisation via TLR3 (K. Li et al. 2005), empêchant ainsi la détection tardive de l'infection par le VHC.

Le VHC va aussi réguler l'activité PKR durant l'infection, lors de son activation il va inhiber la traduction des ARNm de la cellule hôte et notamment ceux des ISGs et des IFNs (Garaigorta and Chisari 2009; Arnaud et al. 2010).

La protéine core peut inactiver la voie JAK/STAT en induisant l'expression de son inhibiteur SOCS3, ainsi que la dégradation de STAT1 (Figure 6) (Bode et al. 2003 ; W. Lin et al. 2005). Elle va aussi interagir directement avec STAT3 et activer la voie de signalisation associée nécessaire à la persistance de l'infection (Roca Suarez et al. 2018).



b) Echappement au système immunitaire adaptatif

L'absence d'activité de correction de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) avec une erreur environ tous les 1000 nucléotides (Smith et al. 2014), entraîne une production de virions nommés quasi-espèce chez les patients (Bukh, Miller, and Purcell 1995). Les mutations en découlant sont majoritairement retrouvées au niveau des régions hypervariables (HVR) des glycoprotéines d'enveloppes du VHC (Kurosaki et al. 1993 ; von Hahn et al. 2007). Ces mutations sont responsables de l'évasion du VHC aux anticorps par la modification de l'épitope de reconnaissance de ces derniers (N. Kato et al. 1993 ; Bankwitz et al. 2010). De plus, l'association du VHC aux lipoprotéines permet de masquer certains épitopes et ainsi limiter l'exposition aux anticorps neutralisants (Fauvelle et al. 2016).

Les glycanes jouent également un rôle clé dans cette évasion immunitaire, en effet ils permettent de masquer les sites antigéniques ciblés par les anticorps neutralisants. Il a été montré que la suppression des N-glycanes entraîne une augmentation de l'immunogénicité E1E2 et peut induire une réponse anticorps plus puissante contre le VHC (Lavie et al. 2018)

La transmission cellule-cellule a aussi été montrée comme un moyen d'évasion du VHC pour échapper aux anticorps neutralisants (Brimacombe et al. 2011).

La réponse LT est elle aussi contournée par le VHC. L'absence de l'activité correctrice de la RdRp du VHC responsable des quasi-espèces, va entraîner la présentation de peptides par le CMH muté et non-reconnu par les LT. Ces mutations peuvent aussi jouer un rôle en amont de la présentation et entraîner la dissociation du complexe CMH-peptide ou sa destruction lors de la protéolyse du peptide. Si il y a reconnaissance par les LT, la réponse peut être réduite ou altérée par rapport au peptide d'origine (Bowen and Walker 2005). La réponse des LT_{CD8^+} est très forte durant la phase aiguë de l'infection, mais lors de la mise en place de la chronicité de l'infection celle-ci faiblit (Figure 4). Ce phénomène est dû à une perte progressive des fonctions des LT par le biais de leur surexposition aux antigènes viraux. Les LT_{CD8^+} perdent alors leur capacité à sécréter des cytokines antivirales, comme l'IFN- γ , ainsi que leur capacité à proliférer (Klenerman and Thimme 2012). Cet état de

fatigue des LT_{CD8^+} est caractérisé par l'augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs comme PD-1 et la diminution de CD127 (Radziewicz et al. 2007 ; Golden-Mason et al. 2007), ces cellules présentent alors un profil pro-apoptotique (Radziewicz et al. 2008).

Pour finir, les patients infectés présentent une forte augmentation de cellules T régulatrices (Treg) dans le sang périphérique (Sugimoto et al. 2003 ; Ebinuma et al. 2008). Ces Treg ont alors une activité suppressive sur la prolifération et la production d'IFN- γ des LT_{CD8^+} (Boettler et al. 2005 ; Rushbrook et al. 2005).

IV. Diagnostic et traitement du VHC

L'absence de symptômes clairs à la suite d'une infection par le VHC, entraîne généralement un dépistage des patients tardif. Le développement des tests diagnostic après la découverte du VHC a permis en premier lieu, la diminution de la propagation du VHC par transfusion et l'adaptation des traitements en fonction de la souche virale du patient. Le diagnostic du VHC se base sur la détection de marqueurs viraux et cellulaires de l'infection : présence d'ARN viral, d'anticorps anti-VHC et le taux d'ALAT.

1. Les marqueurs viraux et cellulaires de l'infection par le VHC

La première indication d'une infection par le VHC est une élévation de la concentration d'ARN du VHC détectable dans le sang 1-2 semaines après l'exposition (Farci et al. 1991), suivie d'une augmentation du taux d'ALAT et de bilirubine totale dans le sang avant même l'apparition de symptômes (Cox, Netski, et al. 2005). L'ALAT est une enzyme majoritairement trouvée dans le foie et qui est relarguée dans le sang lors de la dégradation d'hépatocytes corrélant avec l'apparition de lésion du foie. La bilirubine est un pigment de couleur jaune présent dans la bile et provenant de la dégradation de l'hémoglobine, causant notamment l'apparition de jaunisse. L'apparition d'anticorps anti-VHC, appelée séroconversion, se fait environ 6 à 12 semaines après l'exposition au VHC selon les patients (M. J. Alter et al. 1990 ; Farci et al. 1991). Ces anticorps peuvent persister chez les patients durant des années même après élimination du virus (Figure 7A-B).

Ainsi lors d'une infection résolutive, l'ARN du VHC est détectable dans le sang pendant quelques semaines, ainsi qu'un pic d'ALAT dans le sang, le taux de ces deux marqueurs va ensuite diminuer jusqu'à ne plus être détectable. Les anticorps anti-VHC quant à eux seront détectables dans le sang des patients pendant de longues années (J. H. Hoofnagle 1997) (Figure 7A). Si l'ARN persiste 6 mois après l'infection, on parlera alors d'infection chronique ('National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis C 2002

(June 10–12, 2002)' 2002). Dans ce cas on trouvera aussi dans le sang du patient un taux d'ALAT variable supérieur à la norme, mais inférieur à celui observé en phase aiguë. Les anticorps anti-VHC seront quant à eux détectables à vie (J. H. Hoofnagle 1997) (Figure 7B).

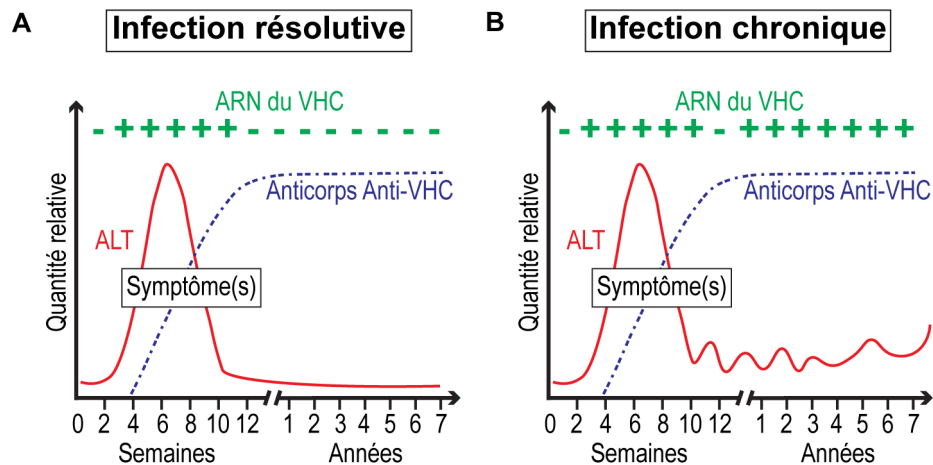


Figure 7 : Profil des marqueurs d'infection par le VHC dans le cas d'une infection aiguë résolutive et celui d'une infection chronique

L'infection est dite résolutive si le taux d'ARN devient indétectable plus de 6 mois après la première détection, le taux d'ALAT va diminuer jusqu'à la normale, le patient présentera une production d'anticorps anti-VHC pendant des années. Dans le cas d'une infection chronique le patient présente un taux d'ARN plus faible qu'en phase aiguë mais toujours présent, un taux d'ALAT variable et une production d'anticorps anti-VHC à vie. Adapté d'après (J. H. Hoofnagle 1997).

2. Diagnostic

La technique de dépistage principalement utilisée est indirecte, elle se base sur la détection et/ou quantification d'anticorps anti-VHC totale. Elle est réalisée par dosage immunologique en « sandwich » approuvé et validé par la « *Food and Drug Administration* » (FDA). Des antigènes recombinant du VHC vont permettre de capturer les anticorps anti-VHC du patient, qui vont ensuite être détectés eux même par un anticorps anti-isotype humain couplé à une enzyme catalysant une réaction qui en présence de son substrat donnera un produit coloré. C'est la densité optique (DO) obtenue et le ratio avec des DO contrôles qui permettent de déterminer proportionnellement la quantité d'anticorps présent chez le patient (Lee et al. 2011).

Cette technique est qualifiée d'indirecte, car elle ne permet pas de déterminer si l'infection est chronique ou résolutive. De plus, si l'infection est récente, le patient n'aura pas encore développé d'anticorps. C'est une technique qui peut donner de

faux positifs. C'est l'utilisation d'un second test approuvé par la FDA qui permet alors de confirmer ou d'invalidier le premier test (Getchell et al. 2013).

Dans le cas d'une détection d'anticorps ou d'une suspicion d'exposition au VHC dans les 6 mois précédant l'analyse, un test direct est réalisé par détection d'ARN viral du VHC. Ce test permet alors de déterminer le stade d'évolution de l'infection : résolutive (absence d'ARN détecté) ou chronique (présence d'ARN détecté au-delà de 6 mois dans le sang). La détection du génome viral peut se faire par rétrotranscription de l'ARN en acide désoxyribonucléique (ADN) qui est ensuite amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) afin d'amplifier l'ADN cible. L'utilisation de PCR en temps réel a permis d'augmenter le seuil de sensibilité de ce test et cette technique ne donne pas de faux positifs, elle est ainsi devenue la technique de référence (Chevaliez 2011).

Le diagnostic du génotype impliqué dans l'infection se base sur la forte conservation de région nucléotidique au sein d'un même génotype du VHC tel que celle de NS5, de core, de E1 ou encore l'extrémité 5'UTR de l'ARN. Elle se fait par séquençage du génome du VHC ou par l'utilisation de kits contenant des sondes complémentaires reportrices de génotypes. (Kumar et al. 2018). Cependant le développement et la mise sur le marché de traitements efficaces contre tous les génotypes permet de traiter les patients sans déterminer le génotype impliqué.

3. Traitement de l'hépatite C

Dans la décennie qui a suivi son identification en 1985, le VHC est devenu un problème majeur de santé publique, de nombreuses thérapies ont été développées dans le but de l'éradiquer efficacement sans détériorer la qualité de vie des patients. L'objectif du traitement est l'élimination du virus c'est-à-dire l'obtention d'une réponse virologique prolongée (RVP). Cette réponse correspond à une indétectabilité de l'ARN du VHC dans le sang dans les 12-24 semaines après l'arrêt du traitement avec des tests de diagnostic sensible (limite inférieure de détection de ≤ 15 UI/mL), le patient est alors considéré comme guéri du VHC ('EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016' 2017).

a) Premier traitement contre le VHC

Le premier traitement à avoir été délivré au patient est l'IFN- α recombinant avant l'identification du VHC (Jay H. Hoofnagle et al. 1986). Ce traitement s'est révélé partiellement efficace avec une réponse chez 1/3 des patients atteints d'une hépatite non A, non B, cependant la RVP n'a été que d'environ 6% (Di Bisceglie et al. 1989 ; Davis et al. 1989). L'adaptation des doses et la durée du traitement a permis de monter à une RVP de l'ordre de 16% (Figure 8). La ribavirine a ensuite été proposée comme monothérapie contre le VHC, cependant celle-ci n'avait d'effet que sur l'ALAT et n'entraînait pas de diminution de l'ARN du VHC (Geoffrey Dusheiko et al. 1996). Cependant, son association avec l'IFN- α a augmenté significativement la RVP des patients à 42% (Thierry Poynard et al. 1998) (Figure 8).

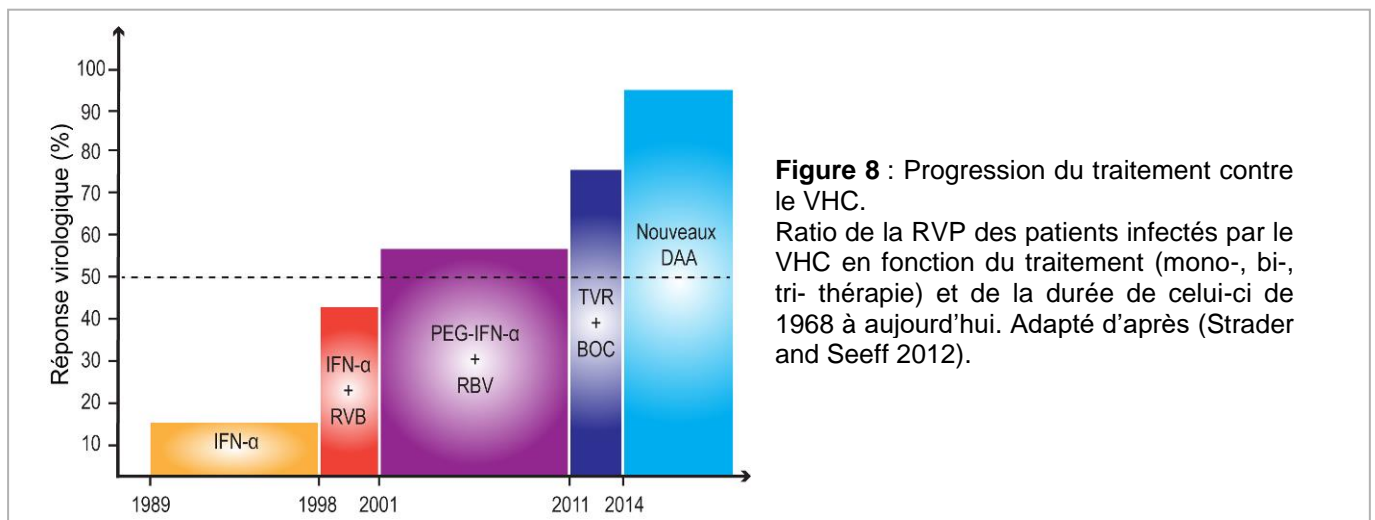


Figure 8 : Progression du traitement contre le VHC.

Ratio de la RVP des patients infectés par le VHC en fonction du traitement (mono-, bi-, tri- thérapie) et de la durée de celui-ci de 1968 à aujourd'hui. Adapté d'après (Strader and Seeff 2012).

L'étape suivante pour améliorer le traitement a été d'allonger le temps de demi-vie de l'IFN- α via la pegylation, ce qui a non seulement amélioré sa demi-vie mais aussi la RVP et diminuer le nombre d'injections nécessaires. Son association avec la ribavirin a permis de monter à 54-56% de RVP (Figure 8) chez les patients (Manns et al. 2001 ; Zeuzem et al. 2009). Cependant, selon le génotype responsable de l'infection, la réponse au traitement varie. En effet, la réponse associée à une infection par le génotype 1 est moins forte que celle obtenue pour les génotypes 2 et 3 avec une élimination du virus chez 80% des patients porteurs du génotype 2-3 et seulement de 10% chez ceux porteurs du génotype 1 (Ghany et al. 2009 ; Strader and Seeff 2012). De plus, ce traitement a de lourds effets secondaires sur les

patients et requiert une modification des doses, voir un arrêt du traitement pour 2 à 10% des patients (G. Dusheiko 1997).

b) Les agents antiviraux à action directe

C'est en 2011 que la première génération des agents antiviraux à action directe (direct-acting antiviral : DAA) a reçu l'autorisation de mise sur le marché, le Telaprevir (TVR) et le Boceprevir (BOC) tous deux des inhibiteurs de la protéine non-structurale NS3/4A (C. Lin, Kwong, and Perni 2006; Venkatraman et al. 2006) entraînant une diminution significative de la réplication virale (Poordad et al. 2011 ; Bacon et al. 2011 ; Jacobson et al. 2011 ; Zeuzem et al. 2011) (Figure 8). Ces deux inhibiteurs ne sont cependant pas utilisés en monothérapie car l'émergence de souches virales résistantes lors des phases de tests cliniques à été observée (C. Sarrazin et al. 2007 ; Susser et al. 2009). Ils sont utilisés en trithérapie combiné à l'IFN- α pegylé et la ribavirine et uniquement pour les patients infectés par le génotype 1. Cependant, à nouveau cette thérapie a donné des effets secondaires importants. Les effets secondaires majeurs sont : anémie, neutropénie (diminution du nombre de neutrophiles circulants) et dysgueisie (altération du goût) pour le BOC (Poordad et al. 2011 ; Bacon et al. 2011) ; anémie, éruption cutanée et gêne ano-rectale pour le TVR (Jacobson et al. 2011 ; Zeuzem et al. 2011).

Des DAA de seconde génération ont alors été développés, ils sont associés à une innocuité et une efficacité renforcée (Kamar et al. 2016 ; Banerjee and Reddy 2016) (Figure 8).

Il existe quatre classes de DAA qui ont tous pour cible les étapes du cycle viral :

- Les inhibiteurs de la protéase NS3/4A qui vont bloquer la protéase et ainsi empêcher la production de protéines virales fonctionnelles (Tableau 1 section a),
- Les inhibiteurs de NS5A, leur mode d'action reste mal compris mais il a été suggéré qu'ils ont de nombreux effets sur la réplication et l'assemblage viral (Tableau 1 section b),
- Les inhibiteurs de la polymérase NS5B. Il en existe deux types : les analogues nucléotidiques (Tableau 1 section c) et les analogues non nucléosidique (Tableau 1 section d). Les premiers vont être incorporés dans le génome viral

par compétition au niveau de la polymérase et entraîner un arrêt de la réplication. Les seconds vont se lier directement dans site allostérique de la polymérase de façon non compétitive et changer son activité biochimique (Horsley-Silva and Vargas 2017).

Section	a	b	c	d
Cible virale	La protéase NS3/4A	Le complexe NS5A	La polymérase NS5B	
Molécule inhibitrice	Telaprevir Boceprevir Simeprevir Paritaprevir Crazoprevir Faldaprevir Asunaprevir Vedroprevir Sovaprevir Voxilaprevir Deldeprevir Glecaprevir	Daclatasvir Ledipasvir Ombitasvir Velpatasvir Elbasvir Odalasvir Ravidasvir Samatasvir Ruzasvir Pibrentasvir	Analogue nucléotidique : Sofosbuvir	Analogue non nucléosidique : Dasabuvir Deleobuvir Beclabuvir Radalbuvir

Tableau 1 : Tableaux récapitulatif des DAA actuellement utilisés dans le traitement du VHC. Adapté d'après (Horsley-Silva and Vargas 2017).

De nos jours, il est estimé que plus de 90% des patients avec une hépatite chronique ont été guéris grâce au DAA (Kamar et al. 2016 ; Banerjee and Reddy 2016) (Figure 8). Des études cliniques impliquant un grand nombre de patients ont confirmé l'efficacité, la sécurité et la tolérabilité des nouvelles associations de DAA. Cependant, plusieurs problèmes restent à résoudre. Le traitement reste coûteux et son accessibilité limitée pour certains patients (pays en développement). De plus de nombreuses personnes infectées ignorent l'être rendant leur traitement impossible. Pour finir les polymorphismes viraux peuvent naturellement apparaître dans les régions ciblées par la DAA et ainsi conférer une résistance aux DAA (Crouch et al. 2018).

c) Les agents antiviraux à action indirecte

En parallèle des DAA, d'autres molécules sont en cours de développement, ce sont des agents anti-viraux à action indirecte. Ces molécules ne ciblent pas directement le virus mais des facteurs d'hôte indispensables à la réplication du virus, on parle d'agent ciblant l'hôte (host-targeting agent : HTA). L'intérêt du développement de ces molécules repose sur le faible taux de mutation dans les cellules eucaryotes comparé au virus, ainsi que sur sa couverture pangénomique des génotypes et sérotypes du VHC. L'IFN- α a été le premier HTA utilisé contre le VHC afin de stimuler la réponse immunitaire de l'hôte. Ses effets néfastes l'ont rendu obsolète mais la recherche avance afin de cibler des facteurs cellulaires nécessaires à l'entrée virale et à la réplication.

ITX-5061 est le premier HTA à être entré en phase de développement clinique. Il bloque l'interaction entre le VHC et SR-B1 et est efficace sur les génotypes de 1-6 *in vitro* (Syder et al. 2011). Cependant un traitement à long terme a mis en évidence l'émergence de souches résistantes possédant une mutation d'échappement au niveau de la protéine E2 *in vitro*. Son utilisation en combinaison avec d'autres molécules antivirales permet de l'éviter. De plus, ce mutant est plus sensible aux anticorps (Zhu et al. 2012). D'autres molécules ont été montrées comme inhibiteur d'entrée, la silymarin/silibinin agit sur le trafic clathrine dépendant du virus *in vivo* (Blaising et al. 2013) et la chloroquine sur le pH des endosomes et l'autophagie (Blanchard et al. 2006 ; Mizui et al. 2010).

Une autre stratégie de ciblage de l'entrée du VHC est basée sur l'utilisation d'anticorps qui vont reconnaître les facteurs d'entrées du VHC comme CD81 (Meuleman et al. 2008), SR-B1 (Lacek et al. 2012) et Claudin-1 (CLDN1) (Mailly et al. 2015) et empêcher leur association au virus.

De nombreux autres inhibiteurs du cycle viral ont été développés tels que des inhibiteurs :

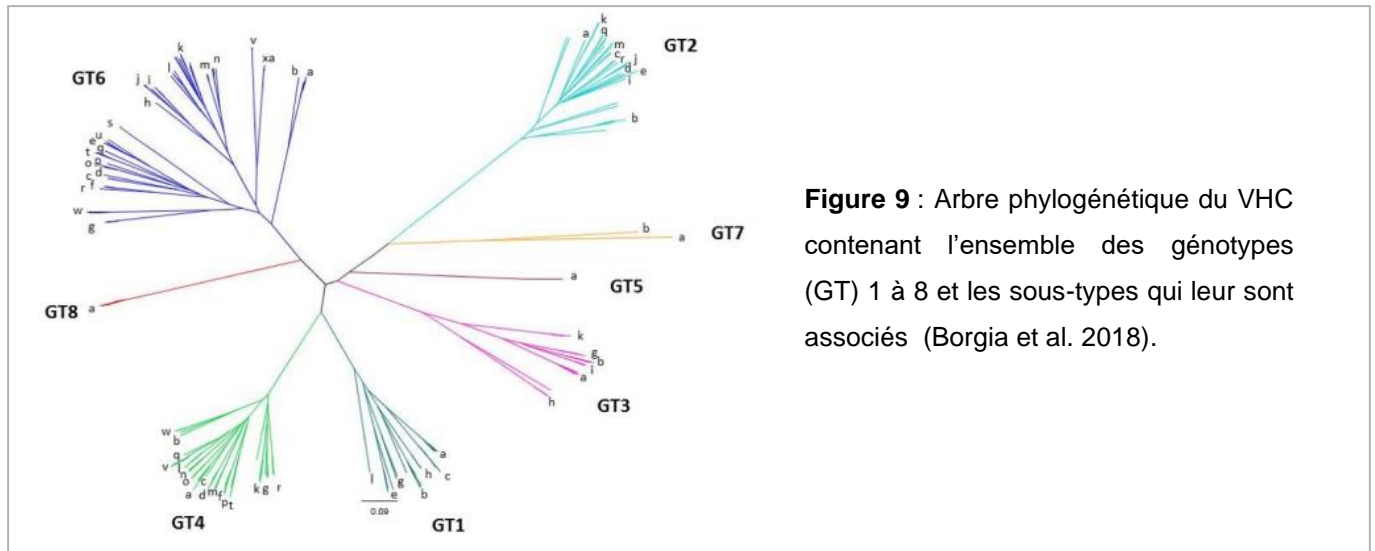
- De la réplication virale : CPI-431-32 inhibe la cyclophilin A (Cyp A) qui interagit avec la protéine virale NS5A (Gallay et al. 2015), miravirsén/SPC3649 séquestre le microARN-122 (van der Ree et al. 2014) et PF-429242 inhibe la biosynthèse de lipide (Blanchet, Seidah, and Labonté 2012).

- De l'assemblage et du relargage des particules virales : Celgosivir inhibe la glucosidase I (Qu et al. 2011), Quercetin inhibe la diglyceride acyltransferase I (Lu et al. 2016), Mipomersen inhibe la synthèse ApoB *in vitro* (Schaefer et al. 2016) .

Pour le moment d'autres essais cliniques sont nécessaires pour définir la place des HTA dans la prise en charge des patients infectés par le VHC ainsi que la détermination de leur rôle par rapport aux DAA ou en combinaison avec ceux-ci (Crouchet et al. 2018).

V. Le virus de l'hépatite C

1. Classification et génotype

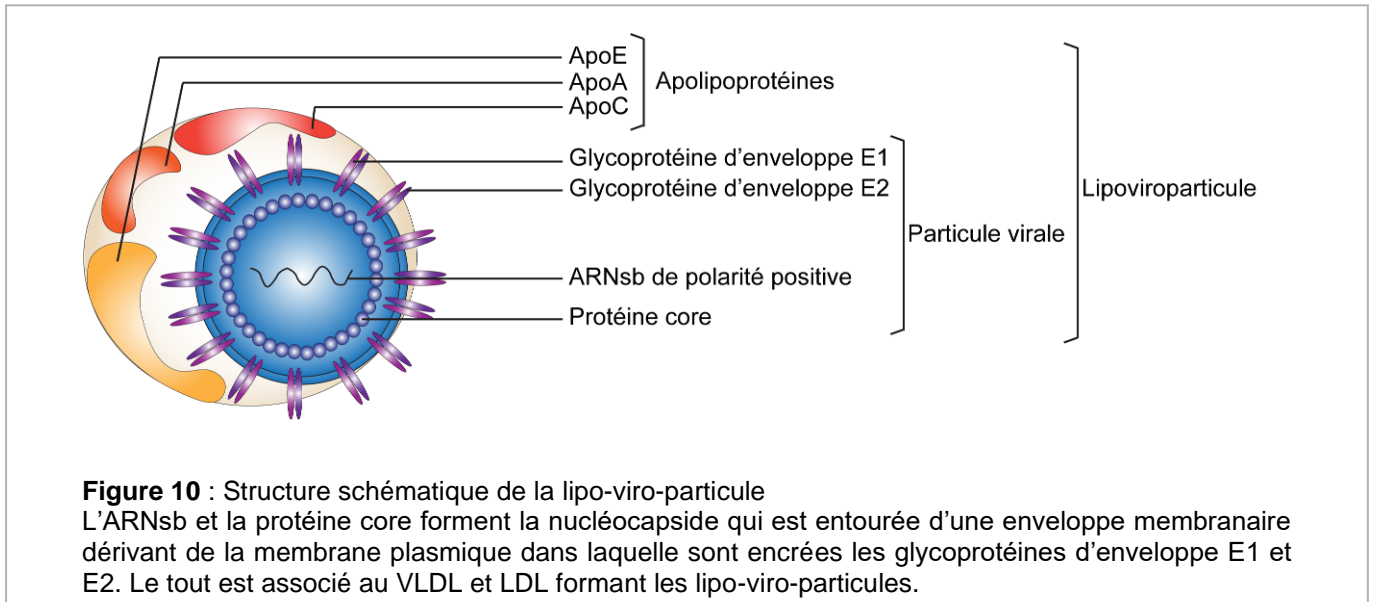


Le VHC est un virus doté d'une enveloppe, contenant un ARN monocaténaire linéaire de polarité positive. Il est affilié à la famille des *Flaviviridae* et au genre des *Hepacivirus*. La famille des *Flaviviridae* regroupe de petits virus enveloppés à ARN simples brins positifs de 9000-13000 bases, on y retrouve le genre *Flavivirus* (le virus de la Dengue, le virus West Nile, le virus de la fièvre jaune, le virus Zika), le genre *Pegivirus* (Human pegivirus) et *Pestivirus* (le virus de la diarrhée virale bovine, le virus de la peste porcine) (Peter Simmonds et al. 2017). Le genre *Hepacivirus* regroupe le VHC mais aussi plusieurs autres virus infectants les chevaux, les rongeurs, les chauves-souris, les vaches et les primates (Scheel, Simmonds, and Kapoor 2015).

Dès la publication de la première séquence du génome virale du VHC en 1989 (Choo et al. 1989), il fut évident que différents isolats présentaient un nombre abondant de diversité génétique avec des similarités de séquence de l'ordre de 68-79%. Il fut alors proposé de classier le VHC en 6 génotypes majeurs composés de sous-types selon une analyse phylogénétique de la protéine non structurale de NS5 (P. Simmonds et al. 1993). En 2015 un 7^{ème} génotypes a été identifié provenant d'Afrique centrale (Murphy et al. 2015) puis un 8^{ème} en 2018 provenant d'Inde (Borgia et al. 2018). Actuellement, les variants du VHC sont donc regroupés en 8 génotypes

et de nombreux sous-types (Figure 9). Bien qu'ils présentent une forte diversité génétique, ils sont considérés comme une espèce unique selon le comité international de taxonomie des virus (ICTV).

2. La particule virale



Les particules virales du VHC se composent d'un génome d'ARN monocaténaire protégé par une capsidie composée de multiples copies de la protéine core, ensemble ils forment la nucléocapside. La nucléocapside est entourée elle-même d'une enveloppe lipidique dérivée de la membrane de la cellule hôte contenant les glycoprotéines de surface E1 et E2 (Figure 10). Les premières observations du VHC se sont faites sur modèle cellulaire *in vitro* infecté à partir de sérum de patient en microscopie électronique. Les premières observations par microscopie électronique dans les années 1990 ont décrit les particules virales comme mesurant environ 45nm, composées d'un noyau dense aux électrons et d'une enveloppe membranaire avec des projections de surfaces (Y. K. Shimizu et al. 1996 ; Serafino et al. 1997). Le développement de système de culture cellulaire pour la production de virions du VHC infectieux (Lindenbach et al. 2005) a confirmé le diamètre des particules virales, certaines comprises entre 30 et 35 nm susceptibles de correspondre aux nucléocapsides virales seules et des particules entre 50 et 60 nm susceptibles d'être des virions infectieux (Takahashi et al. 1992 ; Wakita et al. 2005).

La purification des particules du VHC a mis en évidence la présence de deux types de populations avec une densité située entre 1.06 et 1.25g/mL. Les particules de faible densité sont principalement associées avec des lipides et des lipoprotéines et correspondent aux particules infectieuses. Les particules de haute densité sont associées à des immunoglobulines, elles forment alors des complexes immuns supposés moins infectieux (D. Bradley et al. 1991 ; Hijikata et al. 1993 ; Pumeechockchai et al. 2002 ; André et al. 2002). La proportion de particules virales de faible et haute densité dans le sang des patients varie en fonction du stade de l'infection et des lésions du foie développées (Kanto et al. 1995 ; Petit et al. 2003).

Ces particules de faible densité (entre 1.03 à 1.10 g/mL) hautement infectieuses proviennent de l'interaction des particules virales avec les lipoprotéines sériques, ce qui leur a valu le nom de lipo-viro-particule (LVP). On retrouve dans ces LVP des apolipoprotéines comme ApoB-100 ApoE, ApoA-I, ApoC-I et ApoC-III (Thomssen et al. 1992 ; Meunier et al. 2008 ; Catanese et al. 2013) (Figure 10).

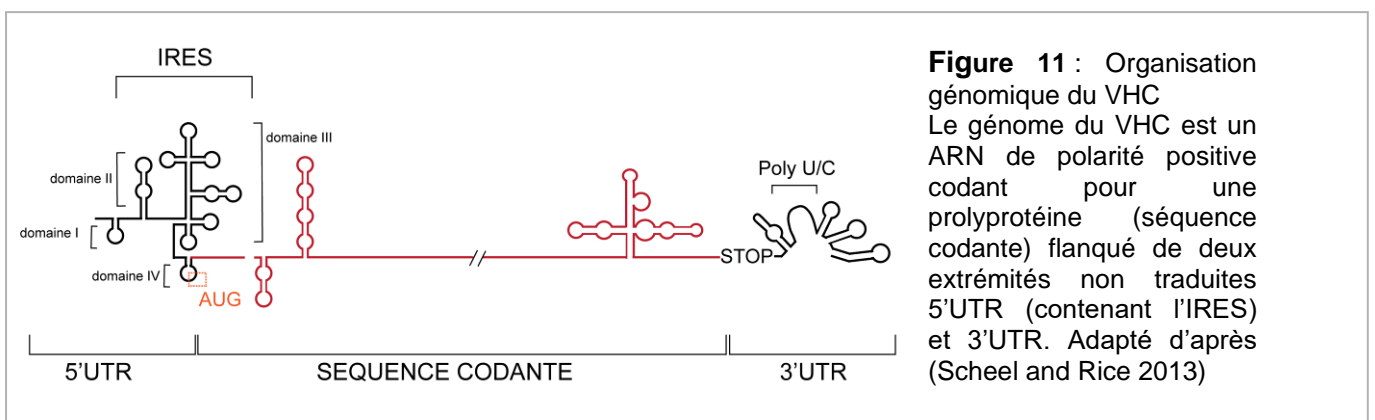
Les apolipoprotéines ont un rôle structural en faisant partie des LVP. Cependant, elles sont aussi impliquées à plusieurs niveaux dans le cycle viral. ApoA-I est impliquée dans la morphogénèse des virions. ApoB-100 permet la liaison des LVP à SR-BI, mais elle est aussi impliquée dans la synthèse et la sécrétion des LVP. ApoC-augmente l'infectivité des virions au travers d'interactions complexes avec SR-BI ; ApoC-II et III participent à la production de de particules infectieuses de VHC. Apo-E permet l'attachement à la surface des cellules par le biais d'interaction avec les facteurs d'entrée HSPG, LDLR et SR-BI (Gastaminza et al. 2008 ; Wrensch et al. 2018). De plus, ApoE joue un rôle dans l'évasion au système immunitaire en masquant les sites de reconnaissance de la glycoprotéines E2 par les anticorps neutralisants (Fauvelle et al. 2016).

Enfin, les particules de VHC contiennent des taux de triglycéride et de cholestérol similaires aux lipoprotéines de très basse densité (VLDL : very low densitylipoprotein) et aux lipoprotéines de basse densité (LDL : low density lipoprotein) (Merz et al. 2011). Ces VLDL matures font défaut dans les cellules

utilisées pour la production de VHC *in vitro* ce qui explique une densité supérieure des particules virales infectieuses ≈ 1.15 g/mL (Jammart et al. 2013).

3. L'organisation génomique

Le génome du VHC est un ARN monocaténaire de polarité positive, il est composé d'un cadre de lecture ouvert (open reading frame : ORF) unique codant une polyprotéine. De part et d'autre de cette ORF unique en 5' et 3' se trouvent des régions non traduites (untranslated region : UTR) très structurées, elles sont cruciales pour la traduction et la réplication virale.



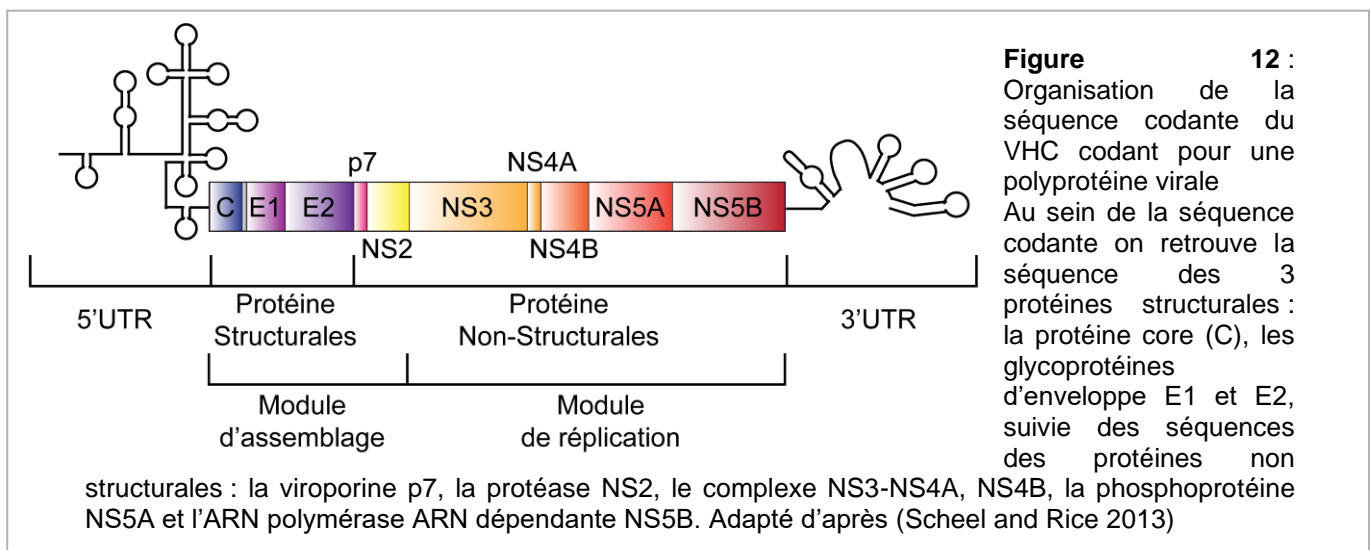
L'extrémité 5'UTR composée de 341 nucléotides, est une région très conservée entre les variants (Han et al. 1991). Elle est composée de 4 domaines structurés (I à IV), contenant des tiges boucles et un pseudo-nœud (Brown et al. 1992 ; Wang et al. 1995). Le domaine I est une tige boucle unique, les domaines II, III et IV forment un site d'entrée interne pour le ribosome (Internal Ribosomal Entry Site : IRES) requis pour une traduction coiffe-indépendante de l'ARN viral (Honda et al. 1996) (Figure 11). De plus, l'extrémité 5'UTR est complémentaire d'un micro-ARN (miRNA) exprimé dans le foie : miR122, sa fixation régule positivement la réplication du VHC (Jopling et al. 2005).

La 3' UTR (Figure 11) quant à elle est composée d'environ 235 nucléotides, elle est organisée en 3 régions, une région variable de 30-40 nucléotides, une longue séquence Poly(U/UC) d'une longueur d'environ 90 nucléotides et terminée par une région hautement conservée de 98 nucléotides. Cette dernière comprend trois structures en tiges boucles : SL1, SL2 et SL3 (Kolykhalov, Feinstone, and Rice 1996;

Tanaka et al. 1996). L'extrémité 3'UTR interagit avec la protéine NS5B (L'ARN polymérase ARN dépendante du VHC) au niveau de ces tiges boucles (J. C. Cheng, Chang, and Chang 1999).

4. Les protéines virales

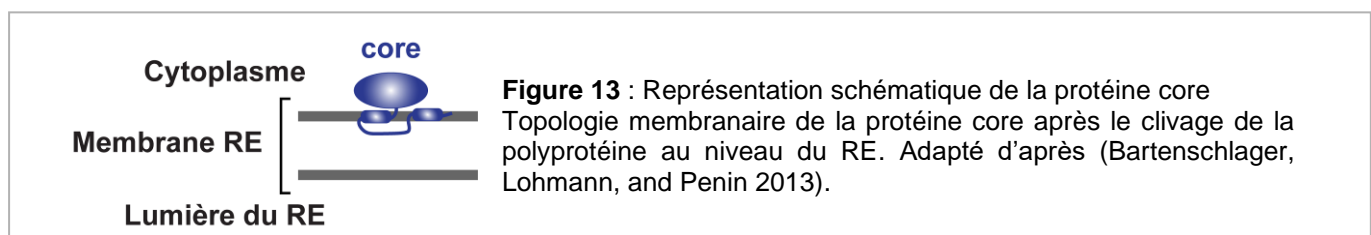
La traduction IRES-dépendante permet l'expression d'une polyprotéine virale qui est maturée par des protéases cellulaires et virales. La polyprotéine est maturée en protéines structurales : core, E1 et E2 ainsi qu'en protéines non structurales : p7, NS2, NS3, NS4A, NS5A et NS5B impliquées dans le cycle réplcatif du VHC (Figure 12).



a) Les protéines structurales

Les protéines structurales sont les protéines qui sont présentes dans la particule virale. Elles sont au nombre de trois : la protéine core qui compose la nucléocapside et les glycoprotéines d'enveloppes E1 et E2 composant l'enveloppe du VHC.

La protéine core



La première protéine encodée par l'ORF unique du VHC est celle qui va former la capsid. La forme mature de core est une protéine membranaire dimérique composée de deux domaines (Boulant et al. 2005).

Le domaine hydrophile N-terminal 1 (D1, acide aminée (aa) 1-177) est impliqué dans la liaison à l'ARN et dans l'oligomérisation, permettant la formation de la nucléocapside. Core a une activité de chaperonne de l'ARN nécessaire dans l'encapsidation du génome lors de la formation de la particule virale (Cristofari et al. 2004). De plus, le domaine D1 est impliqué dans l'interaction avec de nombreux facteurs cellulaires de l'hôte pouvant ainsi impacter de nombreuses fonctions cellulaires (de Chassey et al. 2008).

Le domaine hydrophobe C-terminal 2 (D2 aa 118-117) consiste en une boucle hydrophobe centrale reliant deux hélices α amphipathiques permettant l'interaction de core avec les phospholipides des membranes cellulaires (Boulant et al. 2006).

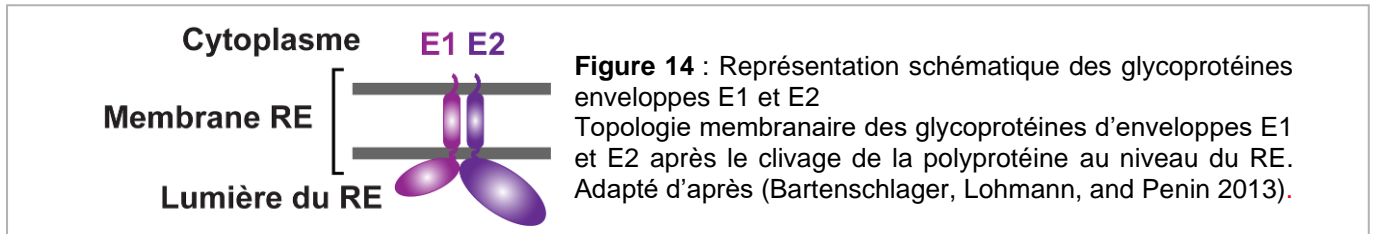
L'association de core avec les gouttelettes lipidiques et son interaction avec NS5A permet l'assemblage de la nucléocapsides (Boulant, Targett-Adams, and McLauchlan 2007; Miyanari et al. 2007 ; Shavinskaya et al. 2007 ; Masaki et al. 2008).

Core a aussi été associé à différents stades de développement de la maladie notamment celui de la fibrose et de l'HCC. L'accumulation de la protéine core du VHC dans les hépatocytes contribue à l'établissement d'un environnement propice à la fibrose via la sécrétion d'IL-8 (Clément et al. 2010) et une stimulation des cellules stellaires hépatiques via TLR-2 (Coenen et al. 2011). Core aurait aussi un rôle dans le développement d'HCC car l'injection de protéine core chez des souris a été montrée comme influençant son développement (Moriya et al. 1998).

D'autre part, lors de la traduction, un décalage de phase de lecture (frameshift) peut se produire et donner une forme tronquée de la protéine core nommée ARFP (alternative reading frame protein) ou core+1 (Walewski et al. 2001 ; Xu et al. 2001 ; Varaklioti et al. 2002). Des études ont validé son existence *in vivo* par notamment la production d'anticorps chez des patients ainsi qu'une activation d'une réponse LT (Dalagiorgou et al. 2011 ; D.-Y. Gao et al. 2010). Récemment, il a

été montré que core+1 augmente la prolifération cellulaire, par l'augmentation du niveau de cycline D1 induisant l'expression de nombreux oncogènes. (Moustafa, Karakasilotis, and Mavromara 2018).

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2



Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 font respectivement 31-35 kDa et 70kDa (Dubuisson 2007) ce sont des composantes essentielles de l'enveloppe virale, nécessaires à l'entrée virale et la fusion (Bartosch, Dubuisson, and Cosset 2003). E1 et E2 sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1, possédant un ectodomaine en N-terminale de respectivement 160 et 334 aa et un petit domaine transmembranaire en C-terminal de 30 aa, s'assemblant en hétérodimère (Deleersnyder et al. 1997). E1 et E2 possède de nombreux sites de glycosylation (Goffard and Dubuisson 2003). Certaines de ces glycosilations ont été montrées comme jouant un rôle majeur dans l'entrée virale et le repliement des protéines (Goffard et al. 2005).

Deux HVR ont été identifiés dans la séquence de la protéine d'enveloppe E2 (Weiner et al. 1991). Dans la première HVR, les variations dans les 27 premiers aa semblent impliquées dans l'entrée virale (Bartosch et al. 2003 ; Callens et al. 2005).

b) Les protéines non structurales

Les protéines non structurales sont exprimées dans les cellules infectées mais ne sont pas incorporées dans les virions néoformés. Elles jouent un rôle direct et indirect dans la réplication virale.

La viroporine p7

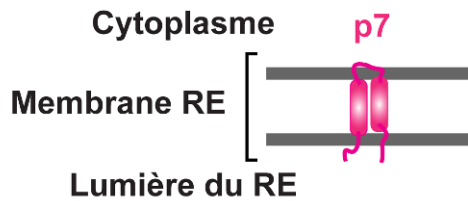


Figure 15 : Représentation schématique de la viroporine p7
Topologie membranaire de la viroporine p7 après le clivage de la polyprotéine au niveau du RE. Adapté d'après (Bartenschlager, Lohmann, and Penin 2013).

La protéine P7 est un polypeptide de 7 kDa (Dubuisson 2007) codé dans la polyprotéine à la jonction entre les protéines structurales et non structurales (C. Lin et al. 1994). C'est une petite protéine de membrane de 63 aa composée de deux hélice- α transmembranaires séparées par une boucle cytosolique chargée positivement et ses extrémités N- et C- terminales sont orientées vers la lumière du RE (Carrère-Kremer et al. 2002). La protéine p7 a été trouvée comme non nécessaire à la réplication virale (Lohmann et al. 1999), cependant le rôle de p7 dans d'autres étapes du cycle viral a rapidement été démontré, tel que son implication dans l'assemblage et l'infectivité des particules virales (Sakai et al. 2003 ; Steinmann et al. 2007 ; Jones et al. 2007). De plus, p7 forme des homo-oligomères qui en s'assemblant forme des structures de canaux ioniques, lui valent sa classification parmi les viroporines (Clarke et al. 2006 ; Chandler et al. 2012). p7 agit de concert avec de nombreuses protéines structurales et non structurales. Elle permet la localisation de core au réticulum endoplasmique (RE) pour l'assemblage des particules virales (Boson et al. 2011 ; Ma et al. 2011). Elle agirait sur le changement de conformation précoce des virions néoformés en supprimant l'acidification des organelles cellulaires (Wozniak et al. 2010) et serait impliquée dans les étapes finales d'encapsidation (Gentsch et al. 2013). La présence de p7 au sein des virions reste elle controversée (Steinmann et al. 2007 ; Griffin et al. 2008 ; Vieryres et al. 2013).

La protéase NS2

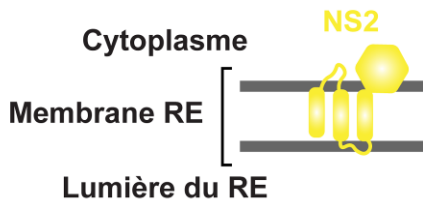


Figure 16 : Représentation schématique de la protéase NS2 Topologie membranaire de la protéase NS2 après le clivage de la polyprotéine au niveau du RE. Adapté d'après (Bartenschlager, Lohmann, and Penin 2013).

NS2 est une protéase de 23 kDa composée de trois domaines transmembranaires en N-terminal permettant son ancrage dans le RE et un domaine protéase à cystéine en C-terminal (Santolini et al. 1995 ; Yamaga and Ou 2002 ; Jirasko et al. 2008 ; 2010).

NS2 n'a pas de rôle direct dans la réplication virale. Cependant, par le biais du clivage de la jonction NS2-NS3, elle permet la libération de NS3 et ainsi la réplication virale (Welbourn et al. 2005 ; Lohmann et al. 1999). NS2 va aussi jouer un rôle important dans les étapes tardives d'assemblage (Yi et al. 2009). En effet, NS2 interagit avec p7, les glycoprotéines E1 et E2, NS3 et NS4A, créant un lien entre protéine structurale et non-structurale au niveau des sites d'assemblage viraux (Selby et al. 1994 ; Steinmann et al. 2007 ; Kiiver et al. 2006 ; Flajolet et al. 2000 ; Popescu et al., 2011 ; Jirasko et al., 2010).

Le complexe NS3-4A

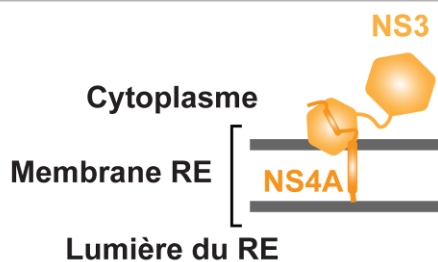


Figure 17 : Représentation schématique du complexe NS3-4A Topologie membranaire du complexe formé par NS3 et son cofacteur NS4A après le clivage de la polyprotéine au niveau du RE. Adapté d'après (Bartenschlager, Lohmann, and Penin 2013).

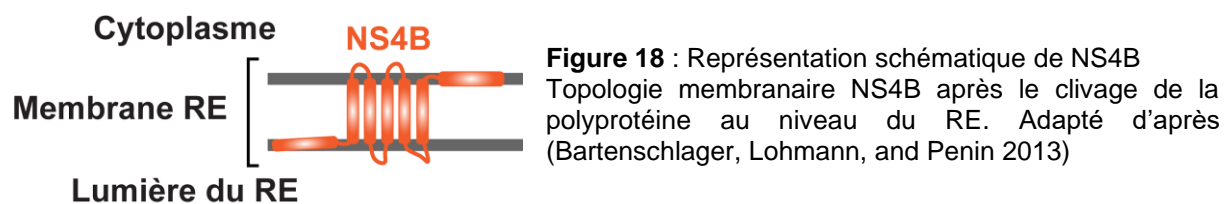
NS3-4A est un complexe non-covalent entre la protéine NS3 (69 kDa) et son cofacteur NS4A (6 kDa) (Dubuisson 2007). NS3 est une protéine multifonctionnelle avec un domaine protéase à sérine en N-terminal et un domaine NTPase/RNA hélicase en C-terminal (Yao et al. 1999). Le domaine protéase est responsable du clivage de quatre sites différents sur la polyprotéine : NS3/NS4A, NS4A/NS4B,

NS4B/ NS5A et NS5A/NS5B (Tomei et al. 1993). Une fois libéré de la polyprotéine NS4A sert de cofacteur à NS3 en augmentant son activité protéolytique (Failla, Tomei, and De Francesco 1994; C. Lin, Thomson, and Rice 1995). NS3 ne possédant pas de domaine transmembranaire c'est son cofacteur NS4A qui permet son ancrage dans la membrane du RE (Brass et al. 2008) ainsi que dans les membranes associées aux mitochondries de manière minoritaire (Horner et al. 2011). Cette seconde localisation peut s'expliquer par la capacité du complexe NS3-4A à cliver MAVS (l'adaptateur mitochondriale de RIG-I) (Meylan et al. 2005).

Il a été démontré que le domaine NTPase/helicase de NS3 se lie et déroule les duplex d'ARN pendant la réplication du génome viral, faisant du complexe NS3-4A un élément important du complexe de réplication virale, également impliqué dans l'assemblage des particules virales (Pang et al. 2002 ; Ma et al. 2008).

Les deux premiers DAAs, le BOC et TVR se lient au site actif du domaine protéase de NS3 (Venkatraman et al. 2006 ; C. Lin, Kwong, and Perni 2006).

NS4B



NS4B est une protéine hydrophobic de 27 kDa, il s'agit d'une protéine membranaire composée de 4 domaines transmembranaires se localisant au niveau du RE avec les autres protéines non structurales (Hügler et al. 2001). son domaine N-terminal se trouve au niveau de la lumière du RE et son domaine C-terminal au niveau du cytosol (Lundin et al. 2003). NS4B induit la formation d'altérations membranaires dérivées du RE, des vésicules membranaires confinées servant d'échafaudage pour le complexe de réplication virale (Egger et al. 2002 ; Gosert et al. 2003)

Le domaine N-terminal est déterminant pour l'oligomérisation de la protéine, en absence d'oligomérisation il n'y a plus d'altération membranaire entraînant l'inhibition de la réplication (Gouttenoire et al. 2010). Le domaine C-terminal quant à lui assure la médiation de l'association membranaire et participe à la formation d'un complexe

de réplication fonctionnelle du VHC en association avec NS5A (Gouttenoire et al. 2009 ; Romero-Brey et al. 2012).

La phosphoprotéine NS5A

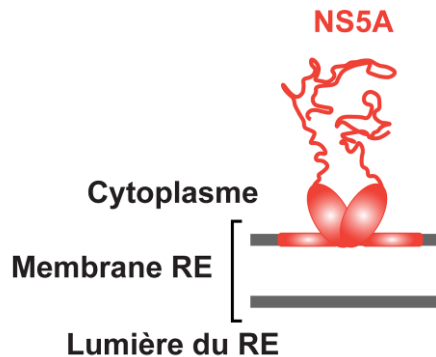


Figure 19 : Représentation schématique de NS5A
Topologie membranaire NS5A après le clivage de la polyprotéine au niveau du RE. Adapté d'après (Bartenschlager, Lohmann, and Penin 2013)

NS5A est une phosphoprotéine liant l'ARN de 447 aa modulant la réplication virale et la formation de particules virales. Après sa traduction NS5A est ancrée dans la membrane du RE par sa partie N-terminale (Penin et al. 2004). Elle est composée d'une hélice alpha-amphipatique en N-terminal suivie de trois domaines séparés par 2 boucles de faible complexité de séquences (Tellinghuisen et al. 2004).

Les trois domaines sont impliqués dans la liaison à l'ARN (Foster et al. 2010). Le domaine I permet une interaction avec l'ARN exclusivement lors de la réplication virale (Tellinghuisen et al. 2004; Tellinghuisen, Marcotrigiano, and Rice 2005), le domaine II serait impliqué dans la suppression de la réponse interférons (Gale et al. 1998). Contrairement au domaine 1, les domaines 2 et 3 sont moins conservés entre les variants de VHC (Smith et al. 2014). Ces deux derniers interagissent avec plusieurs facteurs de l'hôte comme la phosphatidylinositol 4-kinase A (PI4KA) et stimulent ainsi la production de phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) responsable du premier réarrangement des membranes du RE essentiel pour la formation du complexe de réplication (Reiss et al. 2011). Ils servent aussi de substrat à la CypA (Hanouille et al. 2009 ; Verdegem et al. 2011) facteur essentiel à la réplication et l'assemblage viral (Kaul et al. 2009 ; Z. Liu et al. 2009).

De plus, NS5A peut se retrouver dans deux états de phosphorylation : une phosphorylation dite basale phosphorylée de base (56 kDa) ou une forme dite hyper-phosphorylée (54 kDa). Cet état de phosphorylation va directement impacter la réplication virale, la forme de phosphorylation basale la promeut alors que la forme hyper-phosphorylé l'inhibe (Evans, Rice, and Goff 2004; Neddermann et al. 2004;

Appel, Pietschmann, and Bartenschlager 2005). La phosphorylation de NS5A est faite par des kinases cellulaires l'isoforme alpha de casein kinase I et la casein kinase II (CKII) (Quintavalle et al. 2007 ; Tellinghuisen, Foss, and Treadaway 2008). L'interaction du domaine 3 avec la protéine core et la phosphorylation de ce domaine par CKII du domaine 3 a été montrée essentielle pour l'assemblage de particules virales infectieuses (Masaki et al. 2008 ; Tellinghuisen, Foss, and Treadaway 2008).

L'ARN polymérase ARN dépendante NS5B

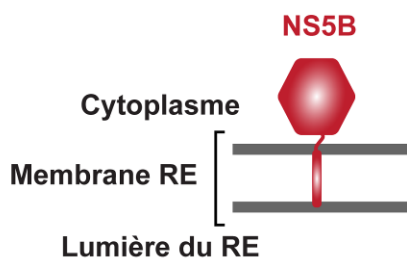


Figure 20 : Représentation schématique de NS5B
Topologie membranaire NS5B après le clivage de la polyprotéine au niveau du RE. Adapté d'après (Bartenschlager, Lohmann, and Penin 2013)

NS5B est la RdRp du VHC de 68 kDa, c'est l'enzyme de la réplication virale. Elle permet la synthèse de brins de polarité négative complémentaire au génome du VHC qui sert de modèle pour la synthèse des brins d'ARN de polarité positive (Behrens, Tomei, and De Francesco 1996). Elle contient 4 domaines conservés dans les différentes RdRp (Poch et al. 1989). La structure du noyau catalytique est comparable à une main droite avec « doigts » « paume » et « pouce » et se situe en N-terminal de la protéine suivie en C-terminal d'un linker et d'un domaine transmembranaire (Lohmann et al. 1997 ; Bressanelli et al. 1999). La particularité de cette enzyme est qu'elle peut initier la synthèse du brin d'ARN sans amorce, elle requiert uniquement la liaison d'ions métalliques divalents (magnésium et manganèse) servant alors de cofacteur au niveau de son domaine catalytique pour entraîner la réaction de polymérisation. Au cours de cette réaction l'ARN se déplace dans un sillon situé entre les domaines des doigts et du pouce qui mène directement sur le site actif. Les nucléosides triphosphates accèdent à ce site via un tunnel situé dans le domaine paume.

La RdRp adopte deux conformations, l'une fermée correspondant à l'état d'initiation de la polymérase et l'autre ouverte qui est l'état d'élongation. La forme fermée de NS5B laisse au cœur du domaine catalytique l'espace pour un ARNsb uniquement (Simister et al. 2009). Le linker présent en C-terminal interagit avec un

élément β -flap au niveau du domaine pouce, où il va participer directement à la formation de la première amorce dinucléotidique (Harrus et al. 2010). Le passage à la forme ouverte pour l'élongation nécessite l'enlèvement du linker et de l'élément β -flap démasquant le site actif, permettant ainsi la liaison à de l'ARNdb (Mosley et al. 2012).

L'association membranaire de la partie C-terminale de NS5B permet une orientation cytosolique du domaine catalytique, l'ancrage à la membrane n'est pas nécessaire à l'activité *in vitro* de l'enzyme mais il l'est pour la réplication de l'ARN viral dans les cellules (Schmidt-Mende et al. 2001 ; Moradpour et al. 2004).

De plus il faut noter que la RdRp ne possède pas d'activité *proofreading*, expliquant la grande diversité génétique des variants du VHC chez les patients (Smith et al. 2014).

5. Le cycle viral

Le VHC est un virus ayant un tropisme majoritairement hépatocytaire, il a cependant été montré comme capable d'infecter d'autres types cellulaires comme les cellules hématopoïétiques incluant les lymphocytes B (Sung et al. 2003) et les cellules dendritiques (Goutagny et al. 2003) ou encore au niveau du système nerveux central dans les astrocytes, les cellules microgliales et les cellules endothéliales (Wilkinson, Radkowski, and Laskus 2009; Fletcher et al. 2010 ; 2012) cependant ces derniers restent controversés. De manière générale le VHC est considéré comme hépatotrope car : ses récepteurs sont majoritairement exprimés par les hépatocytes, son cycle est dépendant d'un micro-RNA spécifique du foie (miR122) et de l'association étroite des particules virales avec les lipoprotéines.

a) L'entrée virale

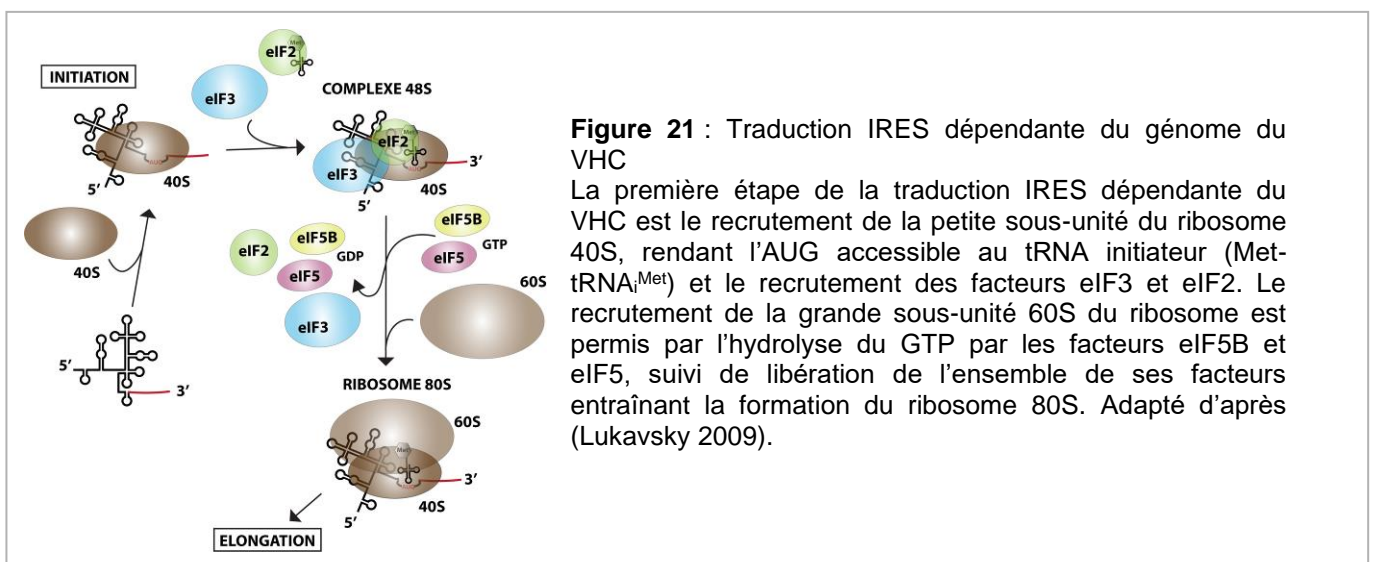
L'entrée virale est un processus complexe comprenant l'attachement du virus à la cellule hôte, la reconnaissance de ces récepteurs, l'endocytose et la fusion membranaire conduisant à la libération de son génome dans la cellule hôte. L'entrée virale sera décrite en détails dans la section VII.4. ci-dessous.

b) La traduction

Après l'étape de fusion le génome du VHC est relargué dans le cytoplasme de la cellule hôte, le génome étant un ARN de polarité positive il va directement servir

à la synthèse de la polyprotéine virale. La traduction et la maturation des protéines virales a lieu dans les membranes du RE de la cellule hôte.

La traduction du génome viral du VHC se fait de manière non canonique, en effet L'IRES permet l'initiation de la traduction coiffe-indépendante ne nécessitant que peu de facteurs d'initiation (eIF2 et eIF3). Ce mode d'initiation est un avantage en cas de stress, en effet la cellule réprime alors la traduction de certains facteurs d'initiation réprimant la traduction coiffe-dépendante (Sonenberg and Hinnebusch 2009). L'IRES est formé par les domaines II, III et IV (Figure 11) ainsi que les premiers nucléotides de la phase codante (Honda et al. 1996). L'IRES du VHC est différente de celui retrouvé chez les *picornavirus* structuralement et fonctionnellement (Niepmann 2009). Le coeur de l'IRES est composé par la jonction à la base du domaine III et IV formant un double pseudo-nœud (C. Wang et al. 1995). Lors de sa liaison à la petite sous-unité du ribosome 40S, un changement de conformation rend le codon initiateur AUG accessible. Son accessibilité rend alors possible le recrutement direct du complexe ternaire : eIF2/GTP/Met-trRNA_i^{Met} et du facteur d'initiation eIF3 afin de former le complexe d'initiation 48S. La liaison de la grande sous-unité du ribosome 60S dépend de eIF5 et eIF5B-GTP, qui par son activité GTPase hydrolyse le GTP associé, conduisant à la libération de eIF5B-GDP et des facteurs d'initiation de la traduction pour former le ribosome 80S et permettre de passer en phase d'élongation de la traduction. (Lukavsky 2009) (Figure 21).



Cependant des études récentes semblerai indiquer que eIF2 n'ai pas requis mais que eIF1A le serait (Jaafar et al. 2016 ; González-Almela et al. 2018)

Différents facteurs (viraux ou cellulaires) vont avoir un impact sur la traduction IRES-dépendante. L'extrémité 3'UTR du génome viral agirait comme la queue polyA des ARNm. Il a été démontré que la région poly U/UC et la région conservée de SL1 stimulent la traduction IRES-dépendante (Ito, Tahara, and Lai 1998; H. Wang et al. 2005 ; Song et al. 2006 ; Bai, Zhou, and Doudna 2013).

La traduction IRES-dépendante ne nécessite que peu de facteurs d'initiation, cependant de nombreux facteurs de l'hôte la stimule, il s'agit de facteurs non canoniques recrutés par l'IRES du VHC tels que la polypyrimidine tract-binding protein (PTB) (Ali and Siddiqui 1995), hnRNP L et D (Hahm et al. 1998 ; Paek et al. 2008), La Protein (Ali and Siddiqui 1997), la poly(rC)-binding protein 2 (Spångberg and Schwartz 1999) NSAP1 (Kim et al. 2004), LSM1-7 (Scheller et al. 2009), ou encore Gemin5 (Pacheco et al. 2009). Ces facteurs agissent en trans et sont nommés ITAF (IRES trans-acting factors) car ils provoquent une stimulation de la traduction en plus de l'activité basale de l'IRES (Niepmann 2009).

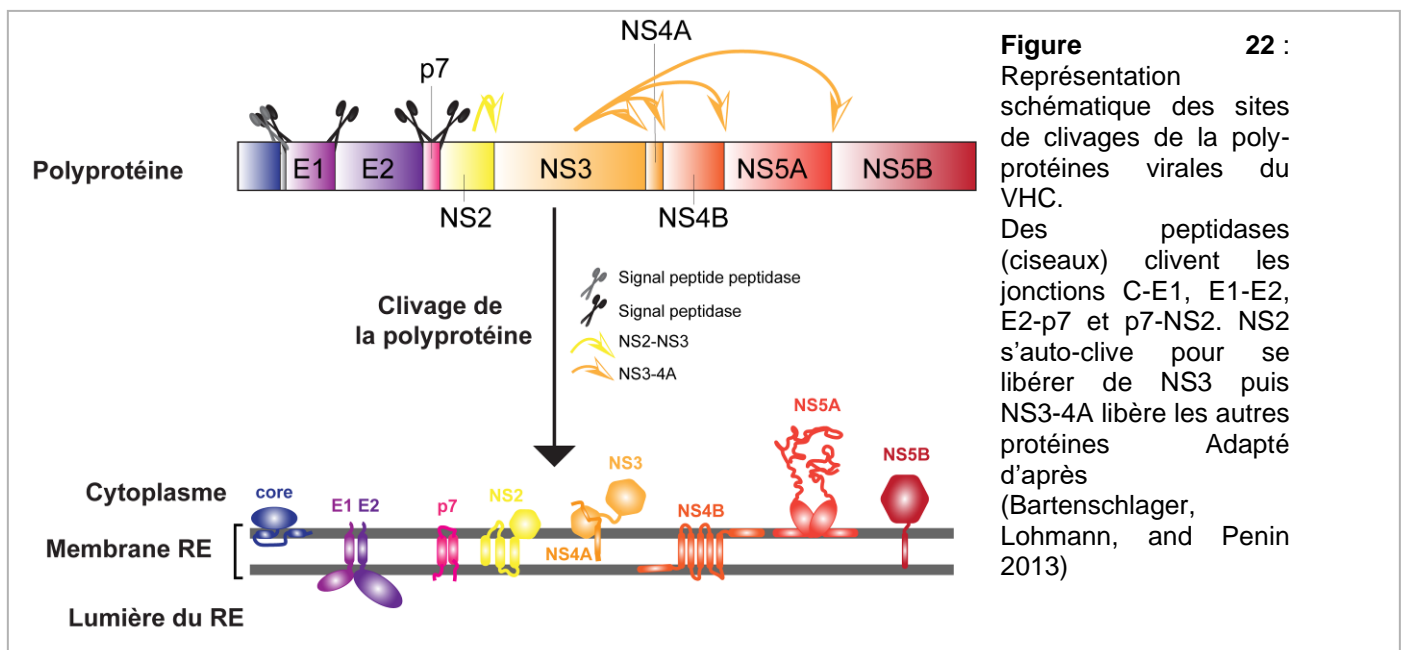
Un autre facteur impliqué est un microRNA exprimé dans le foie, miR-122 en se fixant à l'extrémité 5'UTR du génome et aidant à sa stabilisation ainsi que sa traduction (Henke et al. 2008 ; Conrad et al. 2013).

De plus, il faut noter que certaines protéines virales vont inhiber la traduction IRES dépendante. La protéine core décroît l'activité de l'IRES entraînant une transition vers l'étape de réplication (Jing Zhang et al. 2002), les protéines NS4A et NS5B ont elles été montrées comme capable de cibler le processus de traduction ; elles inhibent ainsi la traduction des protéines cellulaires et la traduction de l'IRES du VHC (J. Kato et al. 2002).

Dès le début de l'élongation la traduction d'une séquence signal entre core et E1 est réalisé par une signal-peptidase du RE entraînant la libération d'une forme immature de core (191 aa). Un second clivage en C-terminal par une signal peptide peptidase donne la forme mature de core (177 aa) (McLauchlan et al. 2002 ; Okamoto et al. 2008).

Après la libération la libération de la protéine core immature, la synthèse de la polyprotéine continue avec celle des glycoprotéines E1 et E2 dans la lumière du RE, où la signal peptidase clive le peptide signal en C-terminal des protéines entraînant une réorientation des domaines transmembranaires de la lumière du RE au cytosol

permettant leur ancrage dans la membrane du RE (Cocquerel et al. 2002). Les protéines non structurales p7, NS2, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B sont aussi composées de domaines transmembranaires et sont rattachées au RE. La viroporine p7 est libérée de la polyprotéine par des signal peptidases aux jonctions : E2-P7 et p7-NS2 (C. Lin et al. 1994). Les protéines NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B vont avoir une orientation cytosolique après traduction, NS2 se libère de la protéine par son activité autocatalytique (A. Grakoui et al. 1993) tandis que les protéines virales restantes sont clivées par la protéase NS3-4A (Tomei et al. 1993) (Figure 22).



c) La réplication

La traduction de la polyprotéine et son clivage, va permettre aux protéines non structurales de répliquer le génome du VHC. Celle-ci se déroule au sein d'un réarrangement membranaire dérivé du RE, permettant de concentrer localement la présence des protéines virales et de coordonner spatialement les différentes étapes du cycle viral (traduction de l'ARN, réplication de l'ARN et assemblage des particules virales). Ce réseau membranaire est aussi connu sous le nom d'usine virale ou *viral replication factories* (vRFs).

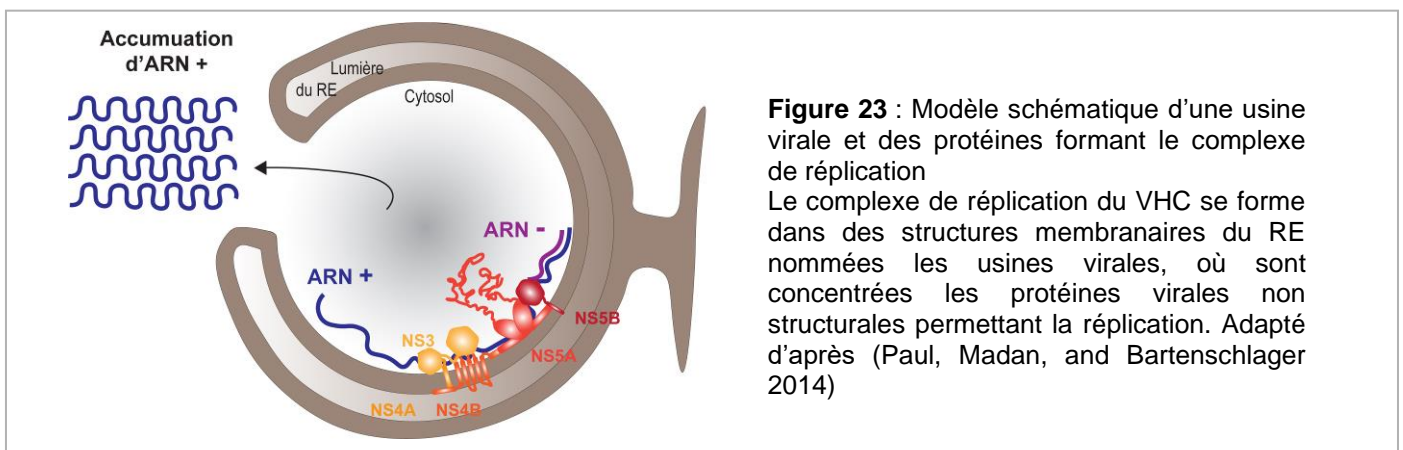
La présence de la protéine NS4B est nécessaire et suffisante pour permettre le réarrangement membranaire et NS5A permet la formation de petites vésicules encastrées dans une matrice membraneuse, donnant un complexe associé à la

membrane contenant toutes les protéines non-structurales du VHC (Egger et al. 2002 ; Gosert et al. 2003 ; Romero-Brey et al. 2012).

Les membranes qui le constituent dérivent majoritairement du RE, leur nombre est corrélé au taux de réplication virale dénotant leur rôle fonctionnel (Romero-Brey et al. 2012 ; Ferraris et al. 2013 ; Paul et al. 2013). Ce réseau est riche en cholestérol et en acide gras, ce qui va jouer sur la fluidité membranaire et du même coup la réplication virale (Kapadia and Chisari 2005).

Le complexe actif de réplication est composé des protéines virales NS3/4, NS4B, NS5A et NS5B ainsi que du facteur cellulaire la CypA.

La réplication du VHC est un processus en deux temps, tout d'abord il y a la formation de l'intermédiaire de réplication, un ARN de polarité négative complémentaire à l'ARN génomique du VHC, puis celui-ci sert de modèle à la production d'ARN de polarité positive. L'ARN de polarité positive est formé en excès par rapport à l'ARN de polarité négative (Figure 23) (Behrens, Tomei, and De Francesco 1996).



C'est la protéine non structurale NS5B, la RdRp qui permet la transcription de l'ARN. Comme décrit précédemment (Cf. 4.b. L'ARN polymérase ARN dépendante NS5B), la synthèse de l'ARN complémentaire de polarité négative est réalisée par la protéine non-structurale NS5B, qu'elle va ensuite utiliser comme matrice pour synthétiser de nombreux ARN de polarité positive. L'ARN est synthétisé à une vitesse estimée de 100 à 400 nt par minute (Simister et al. 2009 ; Harrus et al. 2010 ; Mosley et al. 2012). Ce processus est aussi régulé par des protéines cellulaires de l'hôte. Parmi celles-ci on trouve la Cyp B qui jouent un rôle critique en régulant la

liaison de NS5B à l'ARN (Watashi et al. 2005 ; Kaul et al. 2009) et le microARN spécifique du foie miR122 qui se fixe en 5' UTR de l'ARN viral le stabilisant et le protégeant de la dégradation par des 5'-3' exonucléase (Jopling et al. 2005 ; Shimakami et al. 2012 ; You Li et al. 2013).

d) Assemblage et Sécrétion

Les étapes d'assemblage et de sécrétion du VHC sont liées aux métabolismes des lipides et permettent d'aboutir à la formation de particule virale infectieuse. La première étape est la relocalisation de core du RE au gouttelettes lipidiques cytosoliques (cytosolic lipid droplets : cLDs) (McLauchlan et al. 2002 ; Miyanari et al. 2007), ainsi que la relocalisation de la protéine NS5A (Appel et al. 2008). Ces relocalisations sont permises par une protéine de l'hôte, la diacylglycérol O-acyltransférase 1 (DGAT1) (Herker et al. 2010). De plus l'hyperphosphorylation de NS5A semble recruter NS5A dans les fractions membranaires de faible densité autour des cLDs (Masaki et al. 2014). NS5A, par son domaine de liaison à l'ARN va permettre le recrutement de l'ARN dans ces cLDs (Tellinghuisen, Foss, and Treadaway 2008; Masaki et al. 2008) (Figure 24). D'autres protéines de l'hôte semblent impliquées dans la morphogenèse des gouttelettes lipidiques, telles que la TIP47 (protéine retrouvée associée aux gouttelettes lipidiques) (Vogt et al. 2013) ou la seipin (impliquée dans la maturation des gouttelettes lipidiques) (Clément et al. 2013).

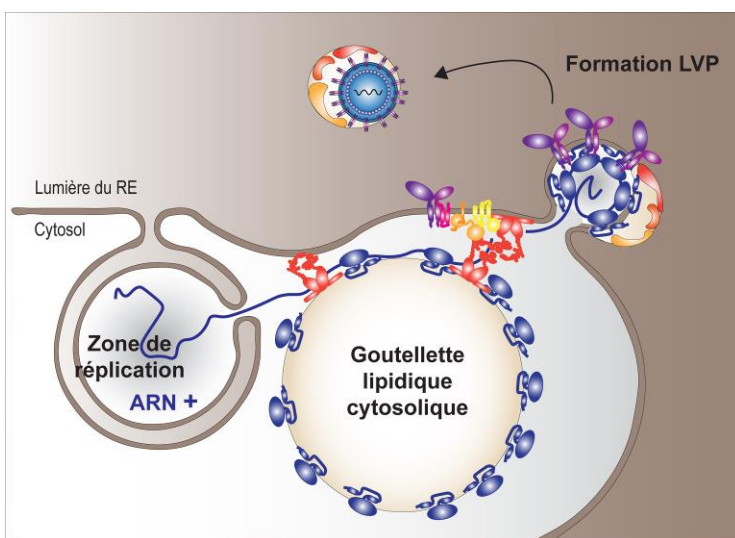


Figure 24 : Modèle schématique la production des lipo-viro-particules de VHC.

Le génome viral est répliqué dans des vésicules à double membrane. NS5A va acheminer l'ARN viral, P7 et NS2 recrute les glycoprotéines E1 et E2 au site d'assemblage au niveau du site d'assemblage. Core va former la nucléocapside en se liant à l'ARN acheminé qui va acquérir son enveloppe par bourgeonnement à la membrane du RE. La particule est ensuite maturée par la voie de sécrétion des VLDL, s'associant alors aux apolipoprotéines. Adapté d'après (Paul, Madan, and Bartenschlager 2014)

La protéine NS2 joue un rôle clé dans l'assemblage, elle interagit d'une part avec le complexe E1/E2/p7 et d'autre part avec le complexe NS3-4A permettant l'acheminement de l'ensemble des protéines au site d'assemblage (Phan et al. 2009 ; Jirasko et al. 2010 ; Popescu et al. 2011). La capacité de core a se lier à l'ARN va permettre la formation de la nucleocapside (Cristofari et al. 2004), qui va ensuite acquérir son enveloppe par bourgeonnement de la membrane du RE, où sont ancrées les glycoprotéines E1 et E2 au niveau des cLDs (Roingeard et al. 2008). Les particules naissantes du VHC subissent une maturation par la voie de sécrétion de VLDL. C'est au cours de cette voie que le VHC s'associe à des lipoprotéines telles que ApoC, ApoB, ApoE, (Chang et al. 2007 ; Meunier et al. 2008 ; Gastaminza et al. 2008). Il est ensuite libéré par exocytose en tant que LVP (Nielsen et al. 2006).

VI. Les modèles d'études du VHC

Depuis la découverte du VHC en 1989 (Choo et al. 1989), de nombreux modèles d'étude du VHC ont été développés allant du modèle animal au modèle cellulaire. Ces modèles ont permis la compréhension des relations virus-hôte, du cycle viral et de la pathogénèse du VHC. De plus l'ensemble de ces connaissances associées aux modèles d'étude du VHC ont permis le développement de nouvelles thérapies contre le VHC.

1. Modèles animaux

Le premier modèle historiquement utilisé pour le VHC est le chimpanzé, il a notamment joué un rôle crucial dans la découverte de la NANBH. En effet dès 1978 il a servi pour l'étude des premières infections par l'injection de sérum de patients porteurs d'une hépatite non-A non-B (H. J. Alter et al. 1978). Dix ans plus tard il a contribué à son identification, son génome a été cloné à partir de chimpanzé qui avait été infecté par le virus (Choo et al. 1989).

Le chimpanzé partage plus de 98% des séquences de son génome avec l'homme, cependant le schéma de la maladie et son devenir chez le chimpanzé ne reflètent pas nécessairement celui chez l'homme. En effet peu de chimpanzés évoluent vers un stade de chronicité (30-40%) (Lanford et al. 2001), et seulement un cas d'HCC a été observé dans ce modèle (Muchmore et al. 1988).

Néanmoins, le chimpanzé permet l'étude des aspects moléculaires, immunologiques et cliniques de l'infection par le VHC. L'étude de la phase aigüe du VHC étant difficile chez l'homme car majoritairement asymptomatique, l'infection expérimentale des chimpanzés permet de surveiller la cinétique virale, la réponse immunitaire de l'hôte, la manifestation de la maladie de manière contrôlée (Y. K. Shimizu et al. 1990 ; Cooper et al. 1999 ; Shoukry et al. 2004 ; Choi et al. 2016). Elle a aussi permis de suivre les résistances associées aux inhibiteurs d'entrée, de NS5A (protéase) et NS5B (RdRp) (Carroll et al. 2009 ; Morin et al. 2012 ; Coburn et al. 2013). Le chimpanzé reste à l'heure actuelle le meilleur modèle d'études *in vivo*, néanmoins les contraintes éthiques et les coûts qui lui sont associés le rendent peu accessible. En

Europe l'utilisation des grands singes est maintenant interdite par directive européenne.

La souris est le modèle animal de laboratoire le plus répandu, cependant ce ne sont pas des hôtes naturels du VHC, ni l'entrée ni la réplication n'a lieu dans les hépatocytes murins (Ploss et al. 2009 ; Dorner et al. 2011). Le modèle murin a alors été adapté pour l'étude du VHC.

Dans un premier temps à partir d'un modèle murin transgénique Alb-uPA , développé pour étudier les troubles de la coagulation néonatale dans les années 1990 (Heckel et al. 1990). Ce modèle présentait une destruction du foie due au transgène uPA, cette défaillance hépatocytaire a pu être comblée par la greffe d'hépatocytes sains qui repeuple alors le foie et restaure la fonctionnalité du foie (Rhim et al. 1994). Les souris uPA ont alors été croisées avec un modèle présentant un syndrome d'immunodéficience sévère (SCID) pour éviter un rejet de greffes et pouvoir être xéno greffés avec des hépatocytes humains (Mercer et al. 2001). La capacité de synthèse et de relargage de particules virales par ces souris en ont fait le premier modèle murin utilisable pour l'étude des VHC *in vivo*, uPA-SCID. Ce modèle peut être infecté aussi bien à partir de sérums de patients (Mercer et al. 2001) que de virus dérivés de culture cellulaire (Akazawa et al. 2013). L'inconvénient de ce modèle est la fragilité des souris, en effet elles présentent un phénotype hépatique létal et doivent être greffées quelques semaines après leur naissance (Meuleman et al. 2005).

Un autre modèle murin a été mis au point, des souris transgéniques FRG. Ces souris sont issues d'un croisement entre des souris immunodéficientes pour RAG2^{-/-} (Rag2 recombinase) et IL-2R γ ^{-/-} (common γ -chain of the interleukin receptor) (Goldman et al. 1998) et des souris déficientes pour FAH^{-/-} (furmarylacetoacetate hydrolase) causant une dégénération du foie pouvant être corrigée par injection de NTCB (Grompe et al. 1993 ; 1995). La transplantation d'hépatocytes humains est alors facile à contrôler comparée aux souris uPA-SCID. Ce modèle a permis des greffes d'hépatocytes humains très efficaces chez les souris adultes, les rendant très susceptibles au VHC (Bissig et al. 2010). Ces deux modèles ne possèdent pas de système immunitaire fonctionnel. Ils n'ont aucune cellule T et B mature/fonctionnelle,

les rendant inutilisables pour étudier l'immuno-pathogénèse du VHC ou encore le développement et l'évaluation de vaccins.

C'est la manipulation génétique des souris qui a permis d'obtenir des modèles murins immunocompétents susceptibles au VHC. Pour cela il faut que l'hépatocyte murin exprime les facteurs nécessaires à l'entrée virale. En 2009, la présence d'au minimum deux facteurs d'entrée humains : Occludin (OCLN) et CD81 étaient nécessaires à l'infection des hépatocytes humains (Ploss et al. 2009). CD81 et OCLN ont pu être exprimés de manière transitoire dans le foie des souris par l'utilisation de vecteurs adénoviraux et permettant ainsi l'entrée du VHC dans les hépatocytes murin *in vivo* (Dorner et al. 2011). Le développement de souris transgéniques exprimant 4 facteurs d'entrées : CD81, SR-B1, Claudin-1 (CLDN1) et OCLN a ensuite été mis au point donnant des souris capables de réaliser le cycle viral complet du VHC et présentant des manifestations hépatologiques (Dorner et al. 2013 ; J. Chen et al. 2014).

La dernière alternative est l'adaptation du VHC au modèle murin. En 2010, l'expression de CD81 murin dans des hépatocytes issus d'un hépatocarcinome humain exprimant faiblement CD81 a permis la sélection d'un variant du VHC-Jc1 par passage successif. Ce variant s'est adapté au CD81 murin devenant capable d'infecter les hépatocytes murins (Bitzegeio et al. 2010). Cependant ce virus ne se réplique pas dans les cellules murines dû à une forte réponse immunitaire innée (Frentzen et al. 2014).

2. Les modèles cellulaires

Le VHC est un virus hépatotrope humain, il se réplique principalement dans les hépatocytes humains. Le développement de systèmes cellulaires pour étudier son cycle viral s'est avéré compliqué. A sa découverte en 1989, le seul modèle disponible était le chimpanzé (Choo et al. 1989). L'infection d'hépatocytes s'est révélée être un échec jusqu'au développement d'un système de réplicon subgénomique en 1999 (Lohmann et al. 1999). Ce système a été mis au point dans des cellules hépatocytaires Huh7 originellement isolées d'un hépatocarcinome humain en 1982 (Nakabayashi et al. 1982). Le réplicon consiste en une construction bicistrionique contenant d'une part l'IRES du VHC contrôlant l'expression d'un gène

de sélection : la néomycine phosphotransférase et d'autre l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) permettant l'expression des protéines non-structurales NS3, NS4A, NS5A et NNS5B du VHC (génotype 1b). L'ensemble des gènes placés sous le contrôle d'un promoteur T7 permet sa transcription *in vitro* en ARN. L'ARN est alors transfecté dans une lignée hépatocellulaire immortalisée Huh7 (Lohmann et al. 1999). Le réplicon ne possédant pas les protéines structurales : core, E1 et 2 ainsi que les protéines non structurales p7 et NS2 et permet uniquement l'étude de la réplication virale.

La sélection continue des clones Huh7 exprimant le réplicon, a mené à l'apparition de sous-clones présentant une permissivité au VHC accrue. La présence du réplicon dans ces sous-clones a été supprimée par des traitements (IFN α et γ /inhibiteur). Les sous-clones obtenus ont alors été désignés ainsi : Huh7.5 (Blight, McKeating, and Rice 2002) et Huh7.5.1 (Zhong et al. 2005). La permissivité accrue de ces cellules au VHC provient d'une mutation dans le gène RIG-I, entraînant l'inhibition de sa reconnaissance et une absence de production d'IFN (Sumpter et al. 2005).

3. Les modèles de virions

En 2003, la mise au point de pseudo-particules ouvre la voie sur la compréhension des étapes précoces du cycle viral, les étapes d'attachement et d'entrée virale. Les pseudo-particules du VHC, les HCVpp, sont des pseudo-particules rétrovirales exprimant les glycoprotéines E1 et E2 à leur surface, l'incorporation d'un gène rapporteur en leur sein permet la quantification de l'entrée virale. Elles sont obtenues à partir de la cotransfection dans des cellules rénales (Hek-293T) de trois constructions plasmidiques : l'un codant pour une protéine rétroviral Gag-pol, le second les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et le dernier pour un gène rapporteur comportant les séquences signal nécessaires à son encapsidation (Bartosch, Dubuisson, and Cosset 2003). Ce système reste limité dans le sens où les HCVpp sont produites dans des Hek-293T, qui ne synthétisent pas les lipoprotéines associées au VHC *in vivo*.

Lors de la découverte du variant JFH1 isolé chez un patient japonais présentant une hépatite fulminante (T. Kato et al. 2001), le réplicon du JFH1 a été montré comme répliatif en Huh7, de plus certaines mutations présentes sur ce

clone semblent conférer un phénotype de réplication plus élevée (T. Kato et al. 2003). L'étude de ce clone a permis 4 ans plus tard la publication d'un système *in vitro* supportant le cycle viral complet du VHC nommé HCVcc (Lindenbach et al. 2005 ; Wakita et al. 2005 ; Zhong et al. 2005). De plus ces particules virales d'HCVcc produite *in vitro*, ont été montrées comme infectieuses *in vivo* (Lindenbach et al. 2005 ; Zhong et al. 2005).

De nombreuses chimères d'HCVcc ont été développées. La combinaison de la région NS3-NS5B de l'isolat JFH1 avec celle de core-NS2 de l'isolat J6 (deux isolats de génotypes 2a) a donné une chimère intra-génotypique qui augmente son aptitude répliquative : J6/JFH1 ou Jc1 (Lindenbach et al. 2006 ; Pietschmann et al. 2006). De plus de nombreux génomes rapporteurs luminescents ou fluorescents ont été créés permettant de suivre la dynamique de réplication du VHC (Catanese and Dorner 2015). La chimère Jc1-Luc est un exemple de ces constructions rapportrices, elle contient la séquence codante de la luciférase firefly sous le contrôle de l'IRES du VHC, la séquence codante pour les protéines virales est quant à elle sous le contrôle de l'IRES de l'EMCV (Koutsoudakis et al. 2006).

Un modèle alternatif a été développé à partir des clones Huh7 exprimant le réplicon subgénomique du VHC. Il permet d'étudier des étapes du cycle indépendamment en apportant en trans les protéines déficitaires dans les clones Huh7 : protéine structurale core, E1, E2 et non structurales p7 et NS2 par un virus helper produit en cellules Hek-293T (Ishii et al. 2008 ; Steinmann et al. 2008 ; Adair et al. 2009). Les cellules produisent ainsi des particules infectieuses nommées *HCV trans-complementary particles* (HCV_{TCP}), ne pouvant effectuer qu'un seul round d'infection en l'absence du virus helper.

VII. Dynamique d'interaction du VHC et ces récepteurs

L'entrée virale est la première étape d'une infection virale, c'est le processus au cours duquel le virus accède aux compartiments intracellulaires. Ce processus se décompose en plusieurs étapes : la diffusion de la particule virale à la membrane cellulaire, sa liaison aux récepteurs, son internalisation et le relargage de l'information génétique dans le cytoplasme. Ces différentes étapes sont strictement dépendantes des interactions virus-hôtes qui sont propres à chaque virus.

L'entrée virale est donc dépendante de l'interaction de la particule virale avec son/ses récepteur(s) mais aussi de la dynamique spatiotemporelle de cette/ces interaction(s).

1. L'interaction virus-récepteur(s)

Lors de son transit extracellulaire, le virus se fixe à des molécules spécifiques de la surface cellulaire permettant leur entrée dans la cellule cible, on parle alors de récepteurs viraux. Ce sont eux qui définissent le tropisme cellulaire d'un virus. En leur absence, le virus ne peut pas infecter la cellule. Ils doivent être distingués des facteurs d'attachement qui sont des molécules de surfaces auxquelles différents virus peuvent se lier et qui jouent un rôle indirect dans l'entrée. La liaison à ces facteurs permet de concentrer les particules virales à la surface de la cellule favorisant ainsi la rencontre virus-récepteur(s). Les récepteurs viraux quant à eux ont une double fonction : ils permettent non seulement la liaison de la particule virale à la cellule hôte mais aussi le transfert de leur génome dans la cellule hôte (Grove and Marsh 2011).

L'accès de la particule virale au cytoplasme de la cellule peut se faire de deux façons. La première consiste en une endocytose classique, après la liaison à un ou plusieurs récepteurs cellulaires, la particule virale est prise en charge par la machinerie cellulaire permettant leur endocytose médié par un/des récepteur(s). La seconde stratégie consiste en une pénétration directe de la membrane plasmique par le biais d'une interaction virus-récepteur(s) cellulaire(s) contournant ainsi la machinerie endocytaire, elle est donc endocytose indépendante (Figure 25).

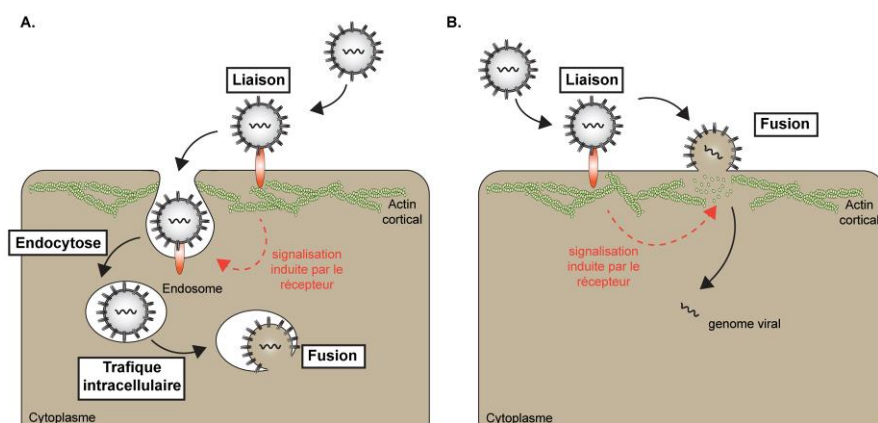


Figure 25 : Schématisation des stratégies d'entrée virale. L'accès du virus au cytoplasme des cellules hôtes peut se généraliser à deux stratégies : (A) par endocytose et échappement des vésicules endosomales par fusion ce processus est nommé endocytose médiée

par récepteur (*receptor-mediated endocytosis*). (B) par pénétration directe à partir de la membrane plasmique de la cellule hôte, appelée entrée induite par le récepteur indépendante de l'endocytose (*endocytosis-independent receptor-mediated entry*). Ce sont des virus enveloppés représentés dans ce schéma mais les virus non enveloppés ont développé des stratégies similaires. Les flèches noires représentent la séquence des événements et les flèches pointillées rouges la signalisation potentielle induite. Adapté d'après (Boulant, Stanifer, and Lozach 2015)

La reconnaissance des récepteurs viraux est soumise à une pression évolutive constante afin d'augmenter l'efficacité de l'infection qui entraîne notamment l'émergence de variants viraux qui peuvent présenter une infectivité modifiée ou encore un tropisme cellulaire différent. De plus l'interaction virus-récepteur peut être un processus très dynamique, en effet un seul virus peut reconnaître un ou plusieurs récepteur(s), qui peuvent différer selon le variant voir même au cours d'une infection.

2. La dynamique d'interaction virus-récepteurs

Les voies d'entrées du virus sont définies par la dynamique d'interaction entre les particules virales et leurs récepteurs à la surface de la cellule. Ces dynamiques d'interactions et les questions en découlant peuvent être directement traitées par imagerie sur cellules vivantes. La microscopie en temps réel à haute résolution avec un suivi de particules virales uniques a permis de suivre des particules virales lors de leur première interaction avec la cellule hôte jusqu'à leur endocytose. Basé sur les nombreuses expériences d'imageries en temps réel Steve Boulant, Megan Stanifere et Pierre-Yves Lozach ont regroupé les différentes dynamiques d'interactions virus-récepteurs en 4 stratégies distinctes (Figure 26).

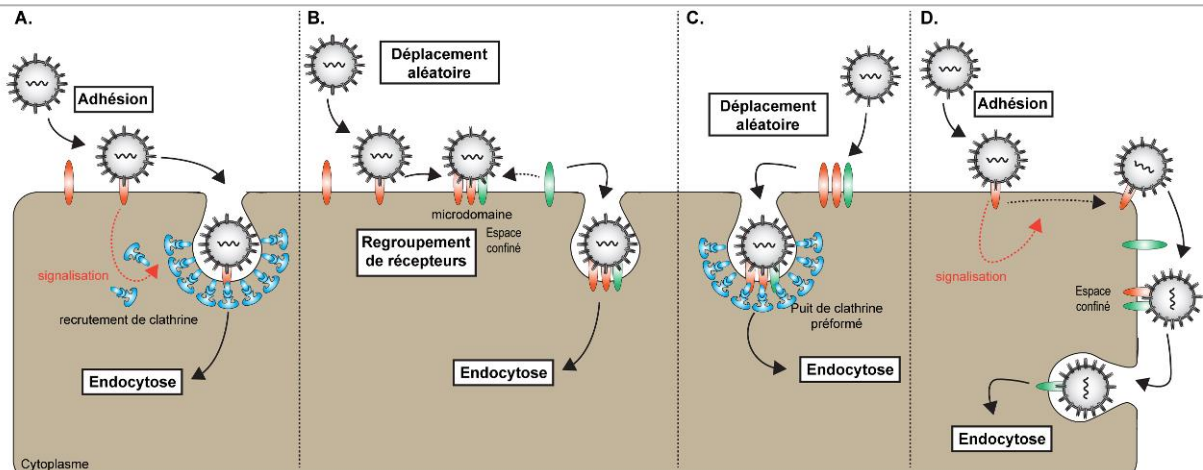


Figure 26 : Schématisation des stratégies d'entrée virale

Les virus ont mis au point différentes stratégies pour interagir avec leurs récepteurs à la surface des cellules hôtes. **(A)** La stratégie « colle (*stick*) » : après avoir atterri à la surface de la cellule et il se lie au(x) récepteur(s) et restent bloqués à un endroit confiné d'où ils seront endocytés de manière passive ou induite par un signal. **(B)** La stratégie « cherche (*seak*) » : après s'être liés à leur récepteur, ils diffusent à la surface de la cellule en recherchant des récepteurs supplémentaires. Le complexe virus-récepteurs sera ensuite confiné spatialement dans un microdomaine membranaire plasmatique de l'hôte à partir duquel il sera endocyté. **(C)** Stratégie « préformé (*preformed*) » : après la liaison à leurs récepteurs, ils diffusent à la surface de la cellule hôte à la recherche de structures endocytiques préformées qu'ils détournent pour faciliter leur internalisation. **(D)** Stratégie « colle et cherche (*stick and seak*) » : les virus peuvent atterrir à la surface des cellules et se lier à un récepteur primaire. Cette liaison initiale induit une signalisation conduisant à une redistribution active du complexe virus-récepteur primaire à la recherche d'un récepteur secondaire qui médie l'absorption du virus. Adapté d'après (Boulant, Stanifer, and Lozach 2015)

a) La stratégie « colle (*stick*) »

Le virus va se fixer à son/ses récepteur(s) au niveau de la membrane cellulaire et rester dans un milieu confiné d'où ils seront endocytés de manière passive ou active (implication d'une cascade de signalisation) (Boulant, Stanifer, and Lozach 2015) (Figure 26A). Le virus de stomatite vésiculaire (VSV) utilise cette stratégie. Des particules virales de VSV purifiées ont été labelisées et incubées sur des cellules exprimant la chaîne légère de clathrine A1 (LCA) en fusion à une protéine fluorescente. Cette incubation a résulté en l'observation par imagerie en temps réel, qu'après la fixation du VSV sur les cellules, le recrutement de Lca permet son internalisation (Cureton et al. 2009).

b) La stratégie « cherche (*seak*) »

Le virus, après sa fixation à son/ses récepteur(s) au niveau de la membrane cellulaire va diffuser à la surface cellulaire afin de trouver des récepteurs supplémentaires, le complexe ainsi formé est confiné dans un microdomaine membranaire permettant son endocytose (Boulant, Stanifer, and Lozach 2015)

(Figure 26B). Le virus de la grippe A (IAV Influenza A virus) utilise cette stratégie. Des expériences d'imagerie en temps réel sur des cellules exprimant LCa et la cavéoline 1 en fusion à des protéines fluorescentes et incubé avec de l'IAV marqué ont montré que les particules virales se posent d'abord sur la surface des cellules et se déplacent vers leur site d'internalisation, où elles s'arrêtent et sont endocytées de manière clathrine dépendante (Rust et al. 2004).

c) Le stratégie « préformé (*preformed*) »

Certains virus, vont diffuser à la surface membranaire après liaison à leurs récepteurs à la recherche de structures endocytaires préformées qu'ils détournent pour faciliter leur internalisation (Boulant, Stanifer, and Lozach 2015) (Figure 26C). Un membre de la famille des *Flaviridae* a été montré comme utilisant cette stratégie, le virus de la dengue (DENV). Des particules de DENV labelisées, incubées avec des cellules exprimant Lca en fusion à une protéine fluorescente ont permis de montrer que DENV rejoint des puits recouverts de clathrine par diffusion (van der Schaar et al. 2008). Une autre étude a montré que le parvovirus canin (CPV) interagit avec son récepteur la transferrine (TfR), il diffuse alors rapidement à la surface membranaire avant d'interagir avec un complexe préexistant d'endocytose. Ces observations ont été faites par imagerie en temps réel sur des cellules exprimant la sous-unité $\sigma 2$ d'AP2 ou la TfR en fusion à des protéines fluorescentes incubées avec des capsides de CPV purifiées et labelisées mettant en évidence la diffusion du complexe virus-récepteurs vers un puit recouvert de clathrine préexistant, qui permet son endocytose (Cureton et al. 2009).

d) Le stratégie « colle et cherche (*stick and seek*) »

Cette dernière stratégie consiste en l'implication de plusieurs récepteurs, primaires et secondaires. La liaison initiale de la particule virale aux récepteurs primaires induit une signalisation conduisant à la recherche de récepteurs secondaires permettant l'endocytose (Boulant, Stanifer, and Lozach 2015) (Figure 26D). L'exemple type de la relocalisation du complexe virus-récepteurs induit par le virus lui-même est celui du virus coxsackie B (CV-B). Il a été montré par immunofluorescence que Le CV-B se lie à son corécepteur DAF (decay-accelerating factor), l'interaction engendre l'activation de Abl, une tyrosine kinase impliquée dans

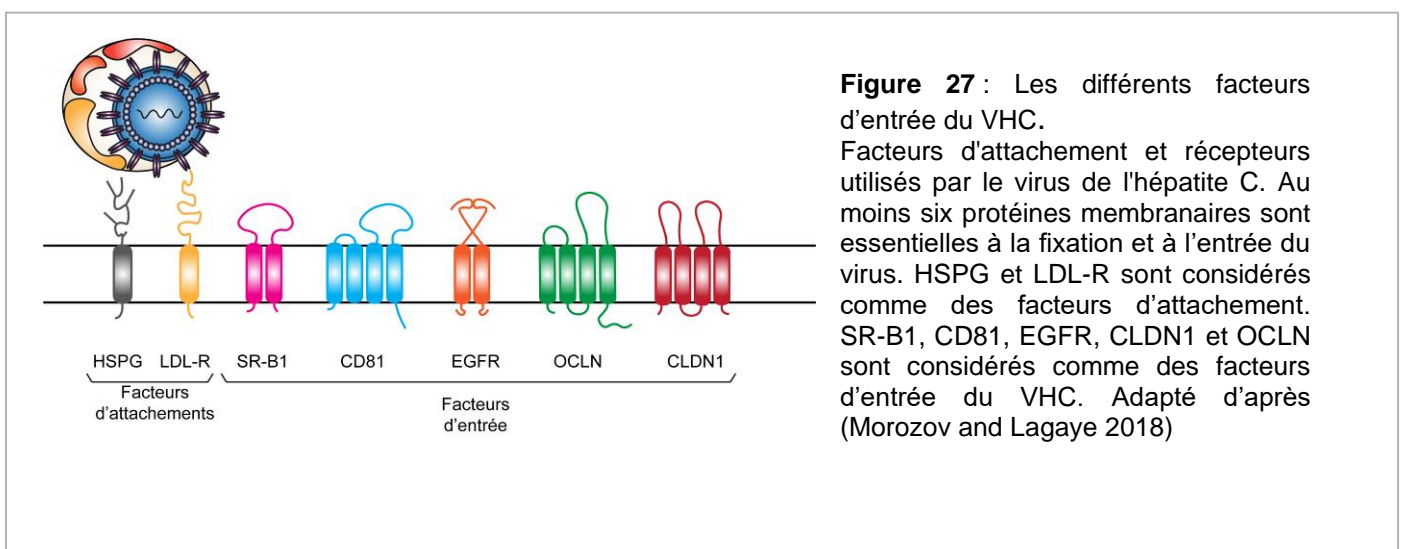
le remodelage de l'actin. De cette activation découle une relocalisation du complexe CV-B/DAF au niveau des jonctions serrées (Tight junction : TJs) permettant son interaction avec son récepteur CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) (Coyne and Bergelson 2006).

Chaque virus adopte une dynamique d'interaction virus-récepteurs différente, la dynamique d'interaction VHC-récepteurs reste pour lors controversée et implique de nombreux facteurs d'entrées.

3. Les molécules de surfaces cellulaires impliquées dans l'entrée du VHC

De nombreux modèles ont été développés afin d'identifier les différentes molécules de surfaces impliquées dans la liaison du VHC à la surface et son entrée dans la cellule cible. Parmi les molécules de surfaces proposées dans ce processus on retrouve les facteurs d'attachement et les facteurs d'entrées :

- Deux facteurs d'attachement ont été décrits pour le VHC : les récepteurs au LDL (*Low density lipoprotein receptor* LDL-R) et les protéoglycanes d'héparane sulfate (HSPG).
- De nombreux facteurs d'entrée ont été décrits pour le VHC au cours de la dernière décennie dont : la tetraspanin CD81 (CD81), le Scavenger-receptor Type B class I (SR-BI), l'epidermal growth factor receptor (EGFR), Occludin (OCLN), Claudin 1 (CLDN1), Ephrin type A receptor 2 (Eph2A).



Au cours de la dernière décennie de nombreux cofacteurs additionnels ont été proposés incluant : le very-low density lipoprotein recetor (Ujino et al. 2016), CD36 (J.-J. Cheng et al. 2016), ankyrin repeat domain 1(Than et al. 2016), E-cadherin (Q. Li et al. 2016), serum response factor-binding protein 1 (Gerold et al. 2015), cell-death-inducing DFFA-like effector B (Wu et al. 2014), transferrin receptor (Martin and Uprichard 2013), Niemann-Pick C1-like 1 (Sainz et al. 2012). Ces facteurs ne seront pas décrits dans mon introduction.

a) Les facteurs d'attachements LDL-R et HSPG

LDL-R est une glycoprotéine de membrane, elle contient des répétitions LDL-R de type A, un EGF-like domain, un ancrage membranaire et une extrémité C-terminal cytosolique. Elle a pour fonction la liaison et l'internalisation de particules lipoprotéiques circulantes riches en cholestérol (Goldstein and Brown 1974; Chung and Wasan 2004). Ce sont les motifs LDL-R de type répété en N-terminal qui permettent la reconnaissance de ces lipo-particules riches en cholestérols par le biais d'une interaction avec apoB-100 et ApoE (Go and Mani 2012).

Les HSPG font partie de la famille des glycosaminoglycanes, ce sont des glycoprotéines contenant une ou plusieurs chaînes d'héparane sulfate (HS) liées de manière covalente. Les HSPG sont impliqués dans de multiples processus cellulaires et ce sont notamment des récepteurs endocytiques impliqués dans le métabolisme des lipides dans le foie (S. Sarrazin, Lamanna, and Esko 2011).

Dans le sang des patients le VHC est sous forme de VLP, celle-ci est captée à la surface des hépatocytes par des liaisons de faible affinité avec les LDL-R et HSPG, c'est le processus d'attachement. L'interaction du VHC avec les LDL-R a été montré par l'utilisation de virus like particule associé à des LDL ainsi que du virus issu de sérum de patient (Agnello et al. 1999 ; Monazahian et al. 1999). D'autres études ont montré que LDL-R permet l'attachement du VHC mais n'est pas indispensable à son entrée dans la cellule (Albecka et al. 2012) et que la liaison du VHC aux LDL-R est permise par la présence d'apoE à la surface des VLPs (Catanese et al. 2013).

L'interaction HSPG-VHC est elle aussi permise par apoE, et que que la longueur minimale d'oligosaccharides HS requise pour une infection par le VHC est un décasaccharide (Xu et al. 2015).

b) Tetraspanin CD81

CD81 est une protéine de surface de 26 kDa composée d'une extrémité C et N-terminale cytosolique et de quatre domaines transmembranaires avec deux boucles extracellulaires (Levy et al. 1991). Ces deux boucles extracellulaires sont de tailles différentes, la première située entre le domaine transmembranaire 1 et 2 fait 28 aa, c'est la petite boucle extracellulaire la seconde de 80 aa entre le domaine transmembranaire 3 et 4 correspond à la large boucle extracellulaire (LEL) (Kitadokoro et al. 2001) (Figure 27). C'est une protéine de surface membranaire quasi-ubiquitaire (sauf plaquettes et globules rouges), impliquée dans de nombreuses réponses biologiques. Dans le foie, elle est exprimée à la fois sur l'endothélium sinusoidale et sur les hépatocytes où CD81 est principalement localisé à la membrane basolatérale (Fénéant, Levy, and Cocquerel 2014).

Des formes recombinantes de la glycoprotéine E2 du VHC ont montré une forte affinité de liaison pour des lignées cellulaires dérivant de lymphome et d'hépatocarcinome humain, non retrouvées pour les cellules murines. A partir de ces résultats, une banque d'ADN complémentaire d'un sous-clone montrant une forte affinité pour E2 a été élaborée. Le criblage de cette banque a permis d'identifier la séquence codante pour la protéine CD81 humaine, ainsi que la détermination du site de liaison de E2 à CD81, il s'agit de la LEL de CD81 et cette interaction est espèce spécifique (Rosa et al. 1996 ; Pileri et al. 1998). C'est l'intégrité de deux ponts disulfure entre des cystéines au sein de cette boucle qui permet l'interaction CD81-VHC (Petracca et al. 2000), de plus 4 autres résidus de LEL semblent impliqués (163-186-188-166) (Meola et al. 2000).

L'implication de CD81 dans l'entrée du VHC a été confirmée par de nombreuses études. Des anticorps anti-CD81 sont capables d'inhiber l'entrée d'HCVpp, HCVcc et de VHC dérivés de sérum de patients (Hsu et al. 2003 ; Bartosch et al. 2003 ; Cormier et al. 2004 ; Jie Zhang et al. 2004 ; Wakita et al. 2005 ; Zhong et al. 2005 ; Koutsoudakis et al. 2006 ; Kapadia et al. 2007 ; Molina et al. 2008), ainsi que des infections *in vivo* (Meuleman et al. 2008). De plus, CD81 a aussi été impliqué dans l'entrée du VHC en formant un complexe de co-récepteurs avec CLDN1 (Harris et al. 2008 ; 2010 ; S. E. Krieger et al. 2010). La formation de ce complexe est dépendante de la signalisation d'EGFR (Lupberger et al. 2011 ; Zona et al. 2013).

c) Scavenger-receptor Type B class I SR-BI

SR-BI est une glycoprotéine de 82 kDa composée d'une extrémité C et N-terminale cytosolique et de deux domaines transmembranaires séparés par une boucle extracellulaire (M. Krieger 2001; Rhinds and Brissette 2004). SR-BI est fortement exprimé dans le foie, il peut se lier à diverses lipoprotéines de haute densité (HDL) et de faible densité (LDL). Il joue un rôle clé dans la médiation de l'absorption sélective cholestérol des HDL et des LDL dans les hépatocytes afin de maintenir l'homéostasie lipidique (Rhinds and Brissette 2004 ; Van Eck et al. 2008).

L'implication de SR-BI dans l'entrée virale a été découverte par la capacité de glycoprotéines recombinantes E2 provenant du génotype de VHC 1a et 1b à se lier à une lignée cellulaire dérivée d'hépatocarcinome humain n'exprimant pas CD81 (Scarselli et al. 2002). D'autres études ont déterminé que c'est la boucle extracellulaire de SR-BI qui interagit avec la HVR-1 de la glycoprotéine E2 et les lipoprotéines associée au virus (Voisset et al. 2005 ; Bartosch et al. 2003 ; 2005). Le VHC utiliserait SR-BI de plusieurs façons, dans un premier temps l'attachement initial du VHC serait indépendant de E2 mais médié par des composants lipoprotéiques tel que ApoE. Puis dans un deuxième temps la fonction de transfert des lipides de SR-BI pourrait faciliter l'accès aux sites de liaison à E2 pour SRBI et CD81 permettant le transfert de la particule virale sur CD81 (Arnaud et al. 2010 ; Dao Thi et al. 2012). L'interaction E2 HVR1 et SR-BI semblerait aussi augmenter l'infectivité de la particule à un niveau post-attachement (Zahid et al. 2013).

d) Les facteurs d'entrée EGFR and Eph2A sont des récepteurs tyrosines

La découverte du facteur de croissance épidermique (EGF) chez la souris (Levi-Montalcini and Cohen 1960 ; Cohen 1965) a mené à la découverte de son récepteur EGFR (Carpenter et al. 1975 ; Cohen, Carpenter, and King 1980). EGFR est un récepteur tyrosine kinase de la famille ErbB, il est composé d'un domaine extracellulaire en N-terminal, un domaine transmembranaire, un domaine cytoplasmique et un domaine intracellulaire kinase en C-terminal (Ferguson 2008). Dans un contexte physiologique normal EGFR régule la coordination de la croissance cellulaire, de la différenciation et de la migration. Une mauvaise régulation

de ces récepteurs et de leur ligand a été mise en cause dans le développement de cancers humains par le biais de processus biologique pro-oncogénique tels que la prolifération cellulaire, angiogenèse, l'inhibition de l'apoptose, la mobilité cellulaire, l'adhésion et la formation de métastases (Wee and Wang 2017).

Identifié en 1990 EphA2 appartient à la famille des Eph-receptor, une sous famille des récepteurs tyrosine kinase (Hirai et al. 1987 ; Lindberg and Hunter 1990). Il est impliqué lui aussi dans deux nombreux processus biologiques, incluant l'angiogenèse, la formation de frontière tissulaire, la migration cellulaire, le guidage axonal et la plasticité synaptique (Dodelet and Pasquale 2000). L'activation canonique de Eph2A (dépendante du ligand et de la tyrosine kinase) inhibe la prolifération cellulaire et la motilité des cellules cancéreuses, à l'inverse la voie non-canonique (ligand et tyrosine kinase indépendante) favorise la survie de la tumeur et les métastases (Zhou and Sakurai 2017).

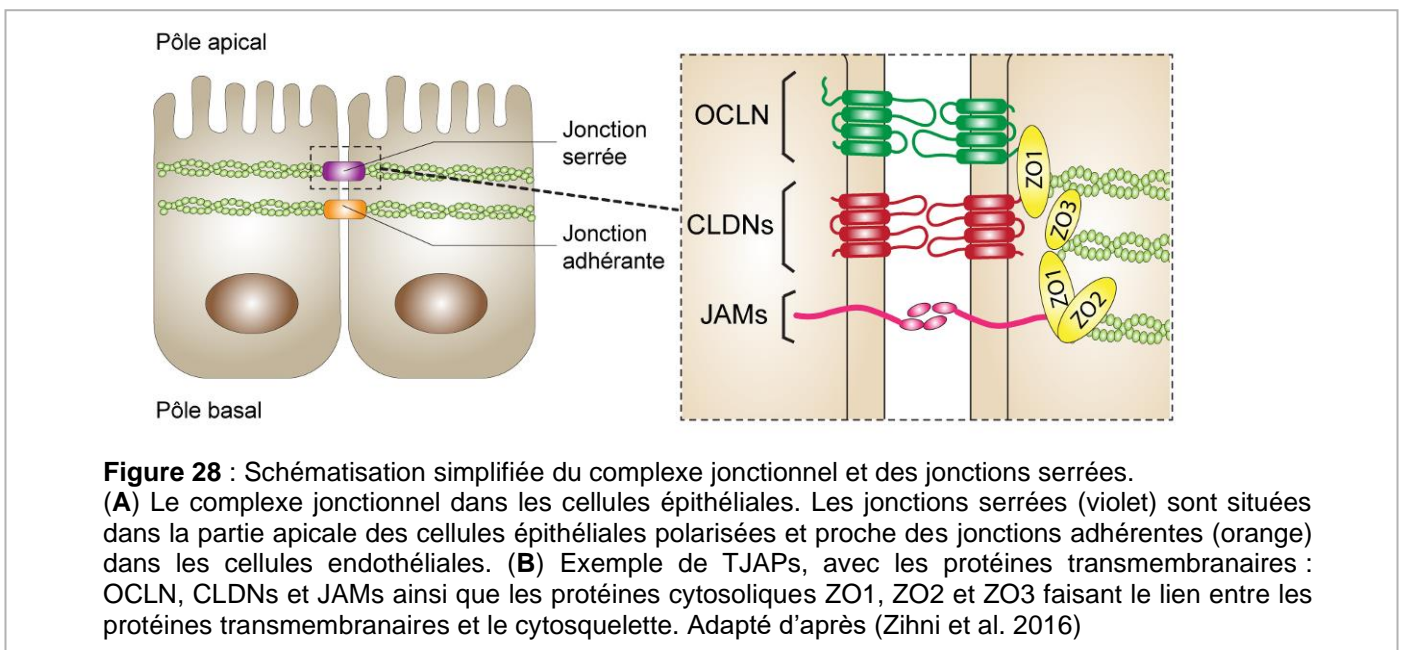
L'implication de ces deux récepteurs tyrosine kinase EGFR et Eph2A dans l'entrée du VHC a été démontrée par un criblage fonctionnel d'ARN interférant des kinases. De plus l'utilisation de l'erlotinib (un inhibiteur spécifique de l'EGFR) et du dasatinib (un inhibiteur spécifique de l'EphA2) peut bloquer l'entrée du VHC dans les hépatocytes. Il n'y aurait pas d'interaction directe entre EGFR et la particule virale mais un signal EGFR dépendant permettant la formation du complexe CD81-CLDN1 (Lupberger et al. 2011 ; Zona et al. 2013). De plus, une étude récente implique EGFR dans la relocalisation du complexe VHC-CD81-CLDN1 au niveau des TJs pour permettre l'interaction VHC-OCLN (Baktash et al. 2018).

e) Les facteurs d'entrée associés aux jonctions serrées CLDN1 et OCLN

Les Jonctions serrées

Les TJs sont des jonctions inter-cellulaires complexes essentielles exerçant une fonction de barrière. Elles maintiennent la polarité apico-basale des épithéliums et des endothéliums en bloquant la diffusion libre de protéines et de lipides entre les deux pôles de la membrane plasmique ainsi qu'en régulant le passage paracellulaire d'ions, d'eau et de molécules. Les TJs s'établissent sur l'extrémité apicale de la surface de la membrane latérale des cellules épithéliales (Zihni et al. 2016).

Les TJs sont composées de protéines transmembranaires nommées protéines associées aux TJs (tight junction associated proteins : TJAPs). On y trouve notamment différentes Claudins (CLDNs), de l'OCLN, des molécules d'adhérence jonctionnelle (JAM) ainsi que des protéines cytosoliques telles que zonula occludens (ZO) -1, -2 et -3 ces dernières forment la plaque jonctionnelle connectant les composants transmembranaires aux cytosquelettes (Förster 2008; Zihni et al. 2016) (Figure 28).



En plus de l'implication des TJAPs dans de nombreuses maladies (Förster 2008), les pathogènes ont élaboré des stratégies pour surmonter ces barrières en utilisant les TJs à leur profit pour infecter ou se disséminer dans leurs hôtes, notamment le coxsackie B virus, rotavirus et le VHC (Torres-Flores and Arias 2015).

Dans le cas du VHC, ce sont les protéines OCLN et CLDN-1 qui sont détournées et lui servent de facteurs d'entrée.

Occludin

OCLN est une protéine transmembranaire de 59 kDa. C'est la première protéine transmembranaire associée au TJs découverte, son nom dérive du latin « occludere » signifiant fermer/occlure (M. Furuse et al. 1993). Elle est composée d'une courte extrémité N-terminale, d'une longue extrémité C-terminale toutes deux cytosoliques, de quatre domaines transmembranaires (TM 1 à 4) séparés de trois boucles : 2 extracellulaires entre TM1 et 2 ainsi qu'entre TM 3 et 4 (EL1 et 2), une intracellulaire entre TM 2 et 3 (IL) (Figure 29). Les différents domaines de OCLN présentent des fonctions et des caractéristiques de régulation distinctes. L'extrémité C-terminal est impliquée dans la localisation cellulaire de OCLN (Matter and Balda 1998; Mitic et al. 1999), plus spécifiquement les résidus 284 à 522 (Lavie et al. 2019). Elle est aussi essentielle à l'interaction avec des protéines chaperonnes permettant son interaction indirecte avec l'actin corticale, tel que ZO1 qui interagit avec le domaine coiled-coil de la partie C-terminale (M. Furuse et al. 1994 ; Yuanhe Li et al. 2005) (Figure 29). Ce domaine permet la dimérisation de l'OCLN lors de la formation des TJs (Y. Chen et al. 1997 ; Juliane K. Walter et al. 2009 ; J. K. Walter et al. 2009). D'autres investigations ont pu mettre en évidence que les boucles extracellulaires et au moins un des domaines transmembranaires jouent un rôle essentiel dans la perméabilité sélective paracellulaire (Balda et al. 2000). Le domaine N-terminal ne semble pas impliqué dans la localisation de l'OCLN aux TJs, cependant en son absence (protéine tronquée) les propriétés d'étanchéité et de barrière des TJs sont perturbées (Bamforth et al. 1999).

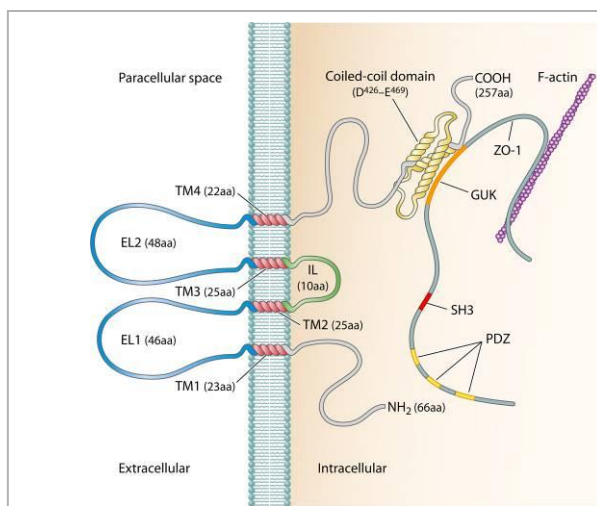


Figure 29 : Schématisation l'OCLN humaine associée à une membrane plasmique.

Les différents domaines de l'OCLN sont indiqués : les 4 domaines transmembranaires TM1-4, les deux boucles extracellulaires EL1 (entre TM1 et TM2) et EL2 (entre TM3 et TM4), la boucle intracellulaire IL (entre TM2 et TM3) ainsi que la partie N et C terminal. L'interaction entre la partie C-terminal et ZO1 est représentée. (Cummins 2012)

Le rôle de l'OCLN au sein des TJs a été démontré dès les années 90. Par exemple lors de sa surexpression en cellules rénales canines (MDCK) la résistance électrique épithéliale mesurée est alors augmentée (McCarthy et al. 1996). Une autre expérience a montré que la destruction de l'interaction OCLN-OCLN au niveau de ces boucles extracellulaires par l'ajout d'un peptide mimant la structure de ces boucles entraîne une augmentation de la perméabilité cellulaire (Wong and Gumbiner 1997). De manière intéressante, des souris invalidées génétiquement (knock-out : KO) pour l'OCLN ont montré des TJs morphologiquement intacts cependant ces souris présentent un phénotype histologique avec des inflammations chroniques ainsi qu'une faible intégrité des TJs dans deux nombreux tissus épithéliaux (Saitou et al. 2000). L'ensemble des données récoltées semblent indiquer une fonction de l'OCLN dans la stabilité des TJs plutôt que dans leur formation.

L'OCLN ne semble pas jouer de rôle dans l'attachement du VHC à la surface de la cellule hôte mais dans des événements post-fixation (Benedicto et al. 2009 ; S. Liu et al. 2010). Les premières études d'imagerie ont mis en évidence que la protéine d'enveloppe E2 altère la localisation des TJs dans les hépatocytes et entraîne une rétention de l'OCLN au niveau du RE, où elle colocalise avec E2 (Benedicto et al. 2008). Son implication dans l'entrée virale du VHC a été identifiée dans des cellules murines exprimant les récepteurs humains CD81, CLDN1 et OCLN, dénotant une spécificité d'espèce ainsi que l'importance des TJs dans ce processus (Ploss et al. 2009). La génération de mutants de délétion d'OCLN a permis de mettre en évidence l'implication de la seconde boucle extracellulaire de l'OCLN dans l'interaction avec la glycoprotéine E2 du VHC (S. Liu et al. 2010). Des études de cinétique ont montré une implication de l'OCLN postérieur à SR-B1, CD81 et CLDN1 (Sourisseau et al. 2013), confirmé par des cinétiques utilisant des anticorps anti-OCLN EL1 ou EL2 (Y. Shimizu et al. 2018). De récentes études ont montré l'importance de 3 résidus (281/282/283) de l'extrémité C-terminal dans l'infection du VHC (Lavie et al. 2019). La localisation et la manière dont interagit le VHC avec l'OCLN restent controversées (Cf 4. Dynamique d'interaction VHC-récepteurs). Dans les coupes hépatiques l'OCLN est localisé sur la surface apicale des hépatocytes (Mee et al. 2009), mais qu'un pool mineur de cette protéine est aussi exprimé sur la surface basolatérale des hépatocytes. En effet, il a été démontré que l'OCLN trafique le long de la membrane

basolatérale pour rejoindre les TJs (Matter and Balda 1998). L'importance de la localisation subcellulaire de l'OCLN dans l'entrée du VHC est soulignée par le fait que seul l'OCLN et son variant d'épissage localisé à la membrane plasmique permettent l'infection, contrairement aux variants d'épissage ayant une localisation intracellulaire (Kohaar et al. 2010).

Claudin-1

CLDN1 est une protéine transmembranaire de 21 kDa appartenant à la famille des claudins (CLDNs), avec CLDN2 elle fait partie des deux premiers membres de la famille des CLDN découverts. Son nom vient du latin « claudere » signifiant fermer/clos (Mikio Furuse et al. 1998). Les bases de données associées au clonage d'ADNc et de génome ont permis de montrer que la famille des Claudin se compose de 27 membres, elles semblent être exprimées de manière tissu spécifique et certaines CLDNs ne sont exprimées que dans des types cellulaires spécifiques (Tsukita, Furuse, and Itoh 2001; Alshbool and Mohan 2014). Les claudines favorisent l'adhésion de cellule à cellule par des interactions homo ou hétérotypiques avec des cellules voisines, participent au maintien de l'imperméabilité des cellules épithéliales et endothéliales, et confèrent la sélectivité ionique des TJs. Elles sont toutes composées de 4 domaines transmembranaires séparés par deux boucles extracellulaires l'une petite et l'autre plus large ainsi qu'une petite extrémité C-terminal intracellulaire. En C-terminal la plupart de claudins présentent un motif de liaison PDZ qui interagit directement avec les protéines associées au TJs, nommé ZO -1, -2, et -3 (Itoh et al. 1999).

Le blocage des interactions CLDN-ZO1 va mener à des TJs aberrantes, soulevant l'importance de ces interactions pour une correcte incorporation des CLDNs dans les TJs (McCarthy et al. 2000). De plus, il a été montré que les CLDNs jouent un rôle crucial dans la fonction d'imperméabilité des TJs, des mutations dans CLDN-16 et CLDN-4 altèrent respectivement la perméabilité au calcium, magnésium et sodium (Hou, Paul, and Goodenough 2005). Des souris KO-CLDN1 meurent de déshydratation dans la journée qui suit leur naissance en raison de défaut dans leurs fonctions de barrière (Mikio Furuse et al. 2002).

CLDN-1 a été démontré comme impliqué dans l'entrée du VHC par le biais de sa petite boucle extracellulaire. En effet l'utilisation d'anticorps contre celle-ci inhibe l'infection par le VHC (Evans et al. 2007). Il a alors été suggéré que CLDN1 est un corécepteur qui contribue à une ou plusieurs étapes postérieures à la liaison virale. Cela a été confirmé par des essais cinétiques utilisant des anticorps anti-CLDN1 (S. E. Krieger et al. 2010). Il a été démontré que contrairement à l'E2 soluble, les complexes E1E2 du VHC peuvent interagir avec la boucle extracellulaire de CLDN1 et que cette interaction est impliquée dans la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane des endosomes (Douam et al. 2014). D'autre part, l'utilisation de constructions pour surexprimer des versions étiquetées de CLDN1 a montré que CLDN1 interagissait avec CD81 pour promouvoir l'internalisation virale (Harris et al. 2008 ; 2010). De manière intéressante la perturbation de ce complexe par des anticorps anti-CLDN1 définis prévient l'infection par le VHC sans affecter l'intégrité de la TJs (S. E. Krieger et al. 2010 ; Fofana et al. 2010 ; Mailly et al. 2015). De ce fait, un modèle dans lequel la forme extra-jonctionnelle de CLDN1 plutôt que celle localisée au TJs serait impliquée dans l'entrée du VHC a été proposé (Mee et al. 2009 ; Cukierman et al. 2009). Le pool principal de CLDN1 est exprimé aux TJs des hépatocytes et des cellules d'hépatome polarisées, mais une fraction mineure est également localisée aux membranes basales de ces cellules (Mee et al. 2009 ; Reynolds et al. 2008). De plus, l'association de corécepteurs CD81-CLDN1 n'a pu être détectée qu'au niveau des membranes basales (Mee et al. 2009), et c'est EL1 qui semble être la partie essentielle de la protéine pour l'entrée du VHC, alors que la partie intracellulaire du domaine C-terminal de CLDN1 n'est pas nécessaire pour ce processus (Evans et al. 2007), contrairement à l'OCLN (Lavie et al. 2019). D'autres études ont permis de déterminer l'influence d'autres CLDN sur l'entrée du VHC (CLDN-2, -3, 4, -6, -7, -9, -11, -12, -15, -17 et 23) montrant ainsi que CLDN-6 et -9 peuvent remplacer CLDN-1 pour l'entrée du VHC dans des lignées cellulaires 293T déficiente en CLDN1, mais elles ne sont que faiblement exprimées dans le foie (Zheng et al. 2007 ; Meertens et al. 2008).

Les deux facteurs d'entrée du VHC dans la cellule CLDN1 et OCLN se sont également révélés importants pour la transmission cellule à cellule du VHC qui est un

mode de dissémination par lequel le virus évite la surveillance immunitaire de l'hôte (Timpe et al. 2008 ; Witteveldt et al. 2009 ; Brimacombe et al. 2011). La localisation exacte de ce processus sur la membrane plasmique ainsi que les formes (jonctionnelle ou extra jonctionnelle) des protéines restent inconnues.

4. La dynamique d'interaction VHC-récepteurs

L'infection des hépatocytes est le résultat d'une dynamique d'interaction entre le VHC et différents facteurs cellulaires de surface allant du facteur d'attachement aux facteurs d'entrée. C'est un processus complexe composé de multiples étapes qui restent en partie controversées à l'heure actuelle.

Dans le sang des personnes infectées par le VHC celui-ci circule sous forme de LVP riche en lipoprotéine. Ces lipoprotéines vont permettre un attachement du virus à la surface de la cellule en se liant au LDLR et HSPG (Agnello et al. 1999 ; Barth et al. 2003). SR-BI est quant à lui à la frontière entre un facteur d'attachement et un récepteur, il semblerait permettre la liaison aux hépatocytes de manière aspécifique par le biais des lipoprotéines, puis interagit spécifiquement avec la glycoprotéine E2 du VHC entraînant son démasquage qui permet son interaction avec CD81 (Arnaud et al. 2010 ; Dao Thi et al. 2012 ; Meuleman et al. 2012). Une étude de la temporalité de recrutement des facteurs d'entrée du VHC en utilisant des anticorps bloquants dans les cellules HepG2, surexprimant CD81 et miR122 a montré que la liaison aux cellules hôtes est médiée par les glycosaminoglycanes et le SR-BI, tandis que CD81, CLDN1 et OCLN agissaient séquentiellement après la liaison du VHC et avant l'acidification endosomale (Sourisseau et al. 2013).

Temporellement CLDN1 et OCLN seraient donc les deux derniers récepteurs d'entrée requis et leur localisation dans les TJs au niveau du pôle apical des membranes plasmiques soulèvent des controverses. Par conséquent, une stratégie de type « colle et cherche » (Boulant, Stanifer, and Lozach 2015) dans laquelle les particules virales atterrissent d'abord sur la surface de la cellule, puis glissent de la surface de la cellule vers les TJ, a souvent été utilisée pour représenter comment la particule virale atteindrait ses récepteurs (Bartenschlager, Lohmann, and Penin 2013) (Figure 30 encadré vert).

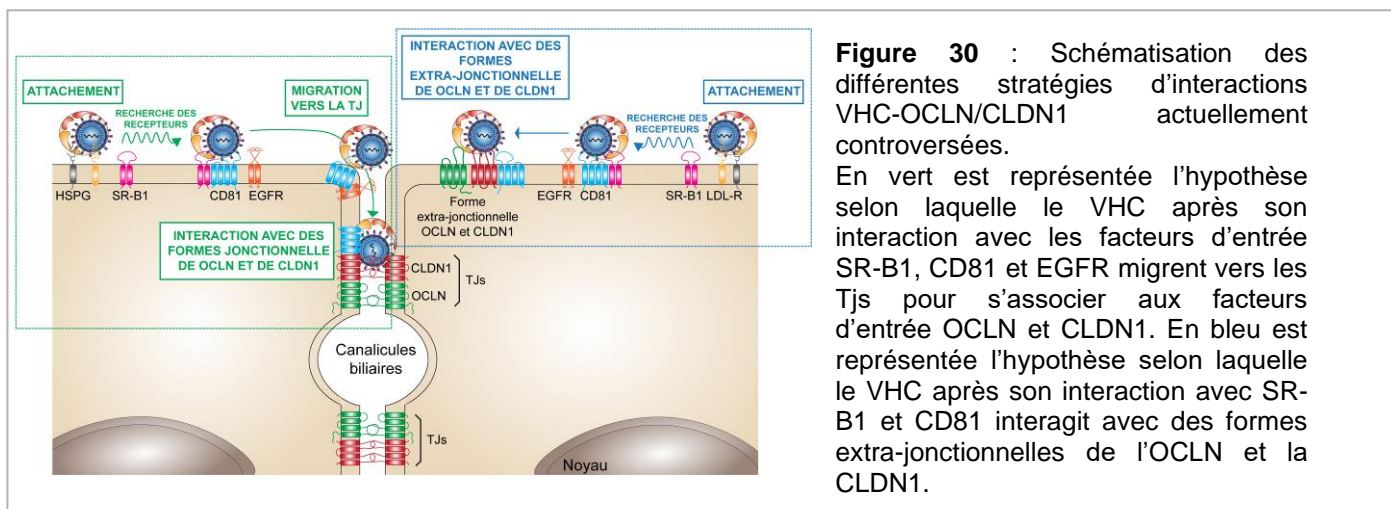


Figure 30 : Schématisation des différentes stratégies d'interactions VHC-OCN/CLDN1 actuellement controversées.

En vert est représentée l'hypothèse selon laquelle le VHC après son interaction avec les facteurs d'entrée SR-B1, CD81 et EGFR migrent vers les Tjs pour s'associer aux facteurs d'entrée OCN et CLDN1. En bleu est représentée l'hypothèse selon laquelle le VHC après son interaction avec SR-B1 et CD81 interagit avec des formes extra-jonctionnelles de l'OCN et la CLDN1.

Une première étude spatiotemporelle réalisée sur des cellules CD81-EGFP ou GFP-Actin surexprimant Huh7.5 n'a pas permis de démontrer le mouvement dirigé des particules du VHC vers les TJs (Coller et al. 2009). Par opposition au Coxsackie B virus, pour lequel une relocalisation des virions entrants vers les TJs a été démontrée (Coyne and Bergelson 2006).

L'hypothèse d'une interaction du VHC avec des formes extra-jonctionnelle de CLDN1 est supportée par l'absence de déstabilisation des TJs lors de l'utilisation d'anticorps anti-CLDN1 bloquant l'infection sans altération des TJs ainsi que l'observation de l'association des corécepteurs CD81-CLDN1 seulement au niveau des membranes basales (Mee et al. 2009 ; Cukierman et al. 2009 ; S. E. Krieger et al. 2010 ; Fofana et al. 2010 ; Maily et al. 2015). La localisation de l'interaction OCN-VHC reste quant à elle controversée. Une étude récente a montré que des hépatocytes humains polarisés exprimant un mutant d'OCN délété en C-terminal restent permissifs au VHC malgré la perte de la localisation de l'OCN aux TJs (Lavie et al. 2019), suggérant que la localisation de l'OCN aux TJs n'est pas absolument nécessaire pour l'entrée du VHC. Le VHC pourrait alors interagir avec des formes extra-jonctionnelles présentant au pôle basolatérale des cellules en faible quantité (Mee et al. 2009). Cette étude ainsi que l'absence de mouvement dirigés dans les expériences d'imagerie en temps réel précédentes (Coller et al. 2009) tendent vers une interaction VHC avec des formes extra-jonctionnelles d'OCN et CLDN1 (Figure 30 encadré bleu).

Cependant ces études ont été réalisées sur des monocouches de culture cellulaire 2D, ne représentant pas le niveau de complexité de l'organe. En 2018, une étude sur des cellules Huh7.5 cultivées en 3D incubées pendant 2 h avec des particules de VHC a montré ces particules virales réparties au centre du sphéroïde, colocalisant avec l'OCLN et CLDN1. Dans cette même étude il a été montré qu'au sein de ces sphéroïdes EGFR se localisait au niveau du complexe SRB1-CD81-VHC, malgré sa nécessité pour l'entrée virale sa présence ne semble pas nécessaire à l'accumulation du VHC au niveau des TJs. Les auteurs suggèrent que le complexe VHC, SR-B1 et CD81 entraîne l'EGFR jusqu'aux TJs afin de stimuler l'internalisation des récepteurs du VHC au niveau de TJs (Baktash et al. 2018). Confirmant ainsi l'absence d'interaction directe entre EGFR et la particule virale mais l'induction d'un signal EGFR dépendant permettant la formation du complexe CD81-CLDN1 (Lupberger et al. 2011 ; Zona et al. 2013) (Figure 30 encadré vert).

Dans le contexte actuel, la localisation et la dynamique d'interaction entre le VHC et les protéines associées aux TJs OCLN et CLDN1 restent encore controversées. Et le rôle exact de l'OCLN dans ce processus reste incompris (Figure 30).

Les interactions VHC-récepteurs entraînent des réarrangements moléculaires de la membrane plasmique aboutissant à l'internalisation des complexes VHC-récepteurs. La liaison du VHC à CD81 entraînerait la phosphorylation de l'Ezrin et la réorganisation de l'actine cortical (Bukong, Kodys, and Szabo 2013). L'Ezrin étant une protéine faisant partie du complexe ERM avec les protéines meosin et radixin. Elles ont un rôle central dans la liaison entre la membrane cellulaire et le cytosquelette d'actine cortical (Fehon, McClatchey, and Bretscher 2010). Les protéines de ce complexe sembleraient réguler différenciellement l'infection du VHC (Bukong, Kodys, and Szabo 2013). Ces mécanismes sont étroitement liés aux réarrangements du cytosquelette d'actine et l'intégrité du cytosquelette d'actine a été montrée comme requise pour l'entrée du VHC dans les cellules (mes résultats (non présentés) et (Coller et al. 2009)).

L'internalisation du VHC se fait par le biais d'un mécanisme d'endocytose clathrine dépendant (Figure 31) (Blanchard et al. 2006 ; Codran et al. 2006 ; Meertens, Bertaux, and Dragic 2006 ; Coller et al. 2009). De plus il a été démontré

que le complexe CD81-CLDN1 était endocyté de manière clathrine et dynamine dépendante corrélant avec de précédentes observations en imagerie d'une entrée du VHC associé avec CD81-CLDN1 (Farquhar et al. 2012 ; Collier et al. 2009). Suite à son internalisation, la particule virale fusionne avec la membrane des endosomes précoces (Meertens, Bertaux, and Dragic 2006; Collier et al. 2009)

La fusion entre l'enveloppe membranaire du VHC et la membrane de l'endosome est la dernière étape de l'entrée virale. Ce processus de fusion serait dépendant du pH et lié à la composition lipidique de la particule virale (Haid, Pietschmann, and Pécheur 2009). L'abaissement du pH au sein de l'endosome ainsi que la formation des complexes VHC-récepteurs pourrait ainsi provoquer le réarrangement des glycoprotéines virales pour déclencher la transition de la protéine liée à la fusion d'un état de pré-fusion à un état de post-fusion (Figure 31). Il a été démontré que des résidus spécifiques de E1 comparable à des domaines de peptide de fusion sont requis pour médier la fusion et l'entrée du VHC (Lavillette et al. 2007 ; Drummer, Boo, and Pountourios 2007 ; H.-F. Li et al. 2009). De plus, une structure de 79 résidus en N-terminal de E1 en dehors des domaines de peptide de fusion prédit, révèle un nouveau repliement (El Omari et al. 2014). Les détails de ce mécanisme restent à résoudre (White and Whittaker 2016). Ces changements conformationnels conduisent à la formation d'un pore de fusion permettant le relargage de la nucléocapside dans le cytosol (Stiasny et al. 2011) (Figure 31).

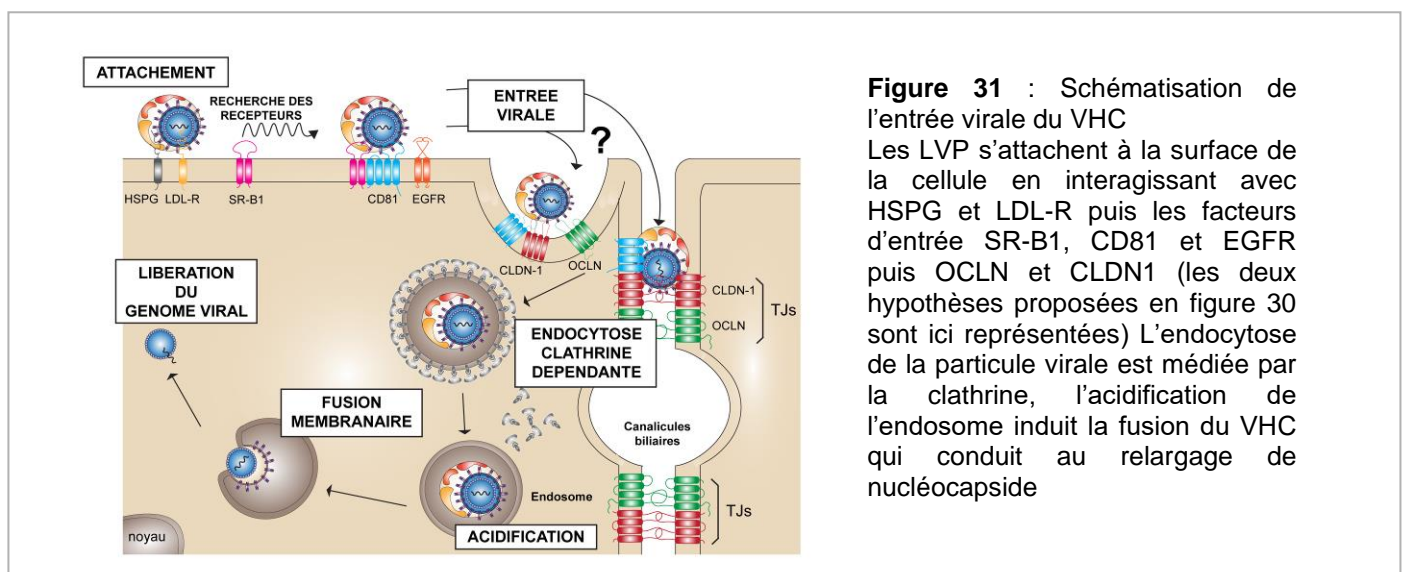


Figure 31 : Schématisation de l'entrée virale du VHC

Les LVP s'attachent à la surface de la cellule en interagissant avec HSPG et LDL-R puis les facteurs d'entrée SR-B1, CD81 et EGFR puis OCLN et CLDN1 (les deux hypothèses proposées en figure 30 sont ici représentées) L'endocytose de la particule virale est médiée par la clathrine, l'acidification de l'endosome induit la fusion du VHC qui conduit au relargage de nucléocapside

OBJECTIF

Les facteurs impliqués dans l'entrée du VHC sont nombreux et on retrouve parmi eux deux protéines transmembranaires associées aux TJs CLDN1 et OCLN (Zeisel, Felmler, and Baumert 2013; Ploss et al. 2009 ; Harris et al. 2008). Des analyses temporelles de recrutement des facteurs d'entrées du VHC ont mis en évidence que CLDN1 et OCLN sont les deux derniers facteurs requis dans le processus d'entrée virale (Sourisseau et al. 2013). La dynamique d'interaction VHC-récepteur est envisagée comme suivant une stratégie de type « colle et cherche » (Boulant, Stanifer, and Lozach 2015). La localisation majoritaire aux TJs des protéines CLDN1 et OCLN soulève des questions sur leur dynamique d'interaction avec le VHC et deux hypothèses ont été proposées. La première impliquant que les particules virales une fois attachées glissent à la surface de la cellule vers les TJs pour atteindre CLDN1 et OCLN (Baktash et al. 2018). La seconde suggère une interaction avec des formes extra-jonctionnelles de CLDN1 et OCLN (Coller et al. 2009). De ce fait, la dynamique spatiotemporelle d'interaction du VHC et de ces deux récepteurs CLDN1 et OCLN reste pour l'heure controversée. Afin d'étudier cette dynamique d'interaction VHC-récepteurs nous avons utilisé une stratégie de visualisation en 3D à haute résolution et en temps réel.

Dans la première partie de mes travaux de thèse je présente la mise au point des différents outils biologiques nécessaires à l'imagerie sur cellules vivantes ainsi que leur caractérisation. Les lignées cellulaires ont été générées à l'aide du système CRISPR/Cas9 (CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats) afin d'éviter la surexpression des protéines associées aux TJs CLDN1 et OCLN et de rester dans un cadre physiologique. Ces lignées expriment les protéines en fusion avec des étiquettes fluorescentes à un niveau endogène donnant les lignées Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} et EGFP-OCLN^{+/+} et ont été caractérisées d'un point de vue fonctionnel. De plus, dans une optique d'étudier l'influence d'autres récepteurs du VHC sur la dynamique d'interaction, les lignées sauvages et EGFP-OCLN^{+/+} ont été invalidées génétiquement à l'aide du système CRISPR/Cas9 pour la CLDN1 donnant les lignées Huh7.5.1 KO-CLDN1 et EGFP-OCLN^{+/+} KO-CLDN1 qui ont été à

leur tour caractérisées. En parallèle, une méthode de purification et de marquage par fluorescence de particules de VHC répliquative a été développée.

Dans la seconde partie de mes travaux de thèse, j'utilise les outils biologiques générés en imagerie pour étudier la dynamique spatiotemporelle d'interaction VHC-récepteurs. Tout d'abord l'influence de la bio-ingénierie sur la perméabilité au VHC des lignées générées a été déterminée. Puis je présente les résultats de l'imagerie sur échantillons fixés et vivants de la lignées EGFP-OCLN^{+/+} et des particules de VHC répliquatives fluorescentes. L'imagerie a permis de déterminer la localisation de l'association VHC-OCLN au sein de notre modèle. De plus, ces observations couplées à des analyses standardisées de suivi de particules virales uniques lors de cette interaction mettent en lumière un nouveau rôle de l'OCLN dans l'entrée du VHC. Pour finir je présente un agent perturbateur de la dynamique membranaire impactant l'infection par le VHC et qui serait susceptible de perturber la dynamique spatiotemporelle du VHC à la surface de la cellule.

Mes travaux font l'objet de deux publications en soumission :

- Camille M.H. Clément, Cristina M. Dorobantu, Maika S. Deffieu, Philippe Ronde, Thomas F. Baumert, Yves Mély, Nilda Vanesa Ayala-Nunez, Raphael Gaudin. « Bioengineering of hepatocellular carcinoma reporter cells using CRISPR/Cas9-based tagging of endogenous Claudin-1 » en revision mineure dans *Biology of the Cell*. (Annexe 1)
- Camille M.H Clément, Cristina M. Dorobantu, Nilda Vanesa Ayala-Nunez, Philippe Rondé, Thomas F. Baumert, Yves Mély, Vincent Lucansky, Raphael Gaudin. « Occludin slows down Hepatitis C virus particle dynamics outside the tight junctions » soumis dans *PLOS Pathogens*. (Annexe 2)

MATERIELS ET METHODES

Lignées cellulaires

La lignée cellulaire Huh7.5.1 dérivant d'un hépatocarcinome (obtenue auprès de F.Chisari) a été cultivée dans du milieu de Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) contenant 4,5 g / L de D-glucose (Gibco) additionné de 10% de sérum de veau foetal (FBS) (Sigma-Aldrich), 1X d'acides aminés non essentiels MEM (Gibco), 1X de gentamicine (10 mg/mL; Gibco). Les lignées cellulaires éditées par bioingénierie CRISPR/Cas9 TagRFP-CLDN1^{+/+} et EGFP-OCLN^{+/+} ont été cultivées dans le même milieu.

Ce milieu a été complété avec 1 µg de puromycine dans le cas des lignées invalidées génétiquement par bioingénierie CRISPR/Cas9 pour la CLDN1 : KO-CLN1 et la luciférase : KO-Ctrl, se trouvant sous pression de sélection.

La lignée cellulaire Hek 293T dérivant de cellule embryonnaire de rein (T;ATCC) a été cultivée dans du milieu de Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) contenant 4,5 g / L de D-glucose (Gibco) additionné de 10% de sérum de veau foetal (Sigma-Aldrich), 1X Pennicilline/Streptomycin (5000 U et 5000µg/mL; Gibco).

Les anticorps

Liste des anticorps utilisés au cours des expériences de cytométrie en flux (FACS), d'immunofluorescence (IF) et de western blot (WB) :

Anticorps	Fournisseur	Expérience(s) associée(s)
Anticorps de souris anti-OCLN (OC-3F10)	ThermoFisher Scientific	WB, IF, FACS
Anticorps de lapin anti-CLDN1	Elabscience	WB, FACS
Anticorps de lapin anti-Ezrin	GeneTex	IF
Anticorps de souris anti-GAPDH [GT239]		WB, FACS
Anticorps de souris anti-ZO-1 Clone 1/ZO-1 (RUO)	BD Biosciences	IF
Anticorps de souris anti-β-actin [AC-15]	Abcam	WB

Anticorps de souris anti-CD81 (TAPA1 antibody [TS81])		
Anticorps d'anti-NS5a-HCV (genotype 1a, 2a)	ViroStat	FACS
Alexa Fluor 647 Donkey anti souris ou lapin Alexa Fluor 568 Donkey anti souris ou lapin Alexa Fluor 488 Donkey anti souris ou lapin	ThermoFisher Scientific	IF, FACS
IgG de chèvre anti-souris et anti-lapin couplés à la HRP	Jackson ImmunoResearch	WB

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des anticorps utilisés en FACS, IF et WB

Bioingénierie CRISPR/Cas9

Insertion de protéines fluorescentes dans le génome (*Knock-in = KI*)

Le plasmide « donneur » utilisé comme matrice pour l'étape de recombinaison homologue a été générée par fusion de deux fragments d'environ 800 nucléotides d'ADN génomique en amont et en aval du codon d'initiation ATG du gène d'intérêt et du cadre de lecture ouvert de la protéine fluorescente (voir Figure 33). Les amorces utilisées pour générer ces 3 fragments sont décrites ci-dessous (les majuscules et les minuscules indiquent des séquences de ciblage différentes) :

- Plasmide donneur TagRFP-CLDN1

F1 amont CLDN1 ATG	5' – gaattcgagctcggtacccGTGTGTGTGTAAATCATGTTGCTCTC – 3'
R1 amont CLDN1 ATG	5' – gactcgctcggcgccc – 3'
F2 amont CLDN1 ATG TagRFP	5' – ggcgcccgagcgagtcATGGTGTCTAAGGGCGAAGAGC – 3'
R2 Linker	5' – ggaaccaccagaaccaccagaacc – 3'
F3 linker aval CLDN1 ATG	5' – ggtggtctggtggtcccTGCCAACGCGGGCTGC – 3'
R3 aval CLDN1 ATG	5' – gtcgactctagaggatccccGCAGCTTCTCCAAAGAGTCTTGC – 3'

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour la génération du plasmide donneur TagRFP-CLDN1

- Plasmide donneur EGFP-OCLN

F1 amont OCLN ATG	5' – gaattcgagctcggtacccCCATGCTCCCACTTCACTGTTC – 3'
R1 amont OCLN ATG	5' – ggctgattgtcaatggtcagctg – 3'
F2 amont OCLN ATG EGFP	5' – cagctgaccattgacaatcagccATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG – 3'
R2 Linker	5' – ggaaccaccagaaccaccagaacc – 3'
F3 linker aval OCLN ATG	5' – ggttctggtggttctggtggtccTCATCCAGGCCTCTTGAAAGTCC – 3'
R3 aval OCLN ATG	5' – gtcgactctagaggatccccGTCTTAACTCCCGACCTCAGG – 3'

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour la génération du plasmide donneur EGFP-OCLN

Les fragments génomiques ont été obtenus par deux PCR indépendantes sur de l'ADN génomique (ADNg) extrait de cellules Huh7.5.1 en utilisant la solution d'extraction d'ADN QuickExtract (Lucigen) et les amorces F1-R1 et F3-R3. La séquence codant pour la TagRFP-T et l'EGFP-OCLN suivie du linker GGS a été amplifiée à l'aide des amorces F2-R2. Les trois produits de PCR ont été introduits dans un vecteur pUC19 par la stratégie d'assemblage de Gibson (NEB) et validés par séquençage d'ADN (Eurofins Genomics).

Les ARN guides de séquence 5' - gagcagatcatggccaacgc - 3' pour CLDN1 et 5' - ggatgacatggctgattgtc - 3' pour OCLN ont été conçu sur le site Internet crispr.mit.edu. Une PCR sur un plasmide contenant le promoteur U6 avec U6 amorce sens 5' - acgggccagatatacgcgtaaggtcgggcaggaagaggg - 3' et une longue amorce antisens contenant les séquences de l'ARNg et tracrRNA achetés sur IDTDNA sous forme d'ultramère a permis de produire la séquence d'ADN codant pour l'ARNg-tracrARN.

Les séquences de ces deux ultramères sont :

- Pour CLDN1 : 5' -acctctagaaaaaaagcaccgactcgggtgccacttttcaagttgataacgga ctagcctattttaacttgctatttctagctctaaaacgcggtggccatgactcgctccggtgttctcctttccacaag - 3'
- Pour l'OCLN : 5' – acctctagaaaaaaagcaccgactcgggtgccacttttcaagttgataacgga ctagcctattttaacttgctatttctagctctaaaacggatgacatggctgattgtccggtgttctcctttccacaag - 3'

L'électrophorèse des produits de PCR a été réalisée sur un gel d'agarose à bas point de fusion (Invitrogen) à 2% et purifiée à l'aide de NucleoSpin Gel et de PCR-Clean-up (Macherey-Nagel) conformément aux instructions du fabricant.

Les cellules Huh7.5.1 ont été ensemencées dans des plaques 6 puits pour atteindre 70% de confluence le lendemain. Les cellules ont été co-transfectées avec 700 ng de chacun des éléments d'ADN suivants : le plasmide « donneur », le produit de PCR purifié codant pour l'ARNg-tracrARN et un plasmide codant pour *Streptococcus pyogenes* Cas9 (spCas9) à l'aide de JetPrime (Polyplus Transfection) selon les instructions du fabricant. Après 72 h, les cellules ont été détachées et ensemencées sur des boîtes plus grandes en fonction de leur taux de croissance. Environ 15 jours après la transfection, les cellules ont été détachées et remises en suspension dans OptiMEM (Gibco) additionné de 1% de sérum de veau fœtal (Sigma-Aldrich), 10 mM HEPES (Gibco) puis filtrées sur un tamis cellulaire stérile de 40 µm (BD Biosciences). Les cellules ont alors été triées par tri cellulaire activé par fluorescence (FACS) en utilisant un instrument FACSAria 2 (BD Biosciences) équipé d'un laser à 561 nm et 488nm et d'une buse de 130 µm. Un nombre initialement faible de cellules (environ 0,2%) présentait un signal fluorescent au-dessus du bruit de fond et deux tris ultérieurs ont été nécessaires pour obtenir un pool d'environ 60-70% de cellules éditées fluorescentes (Figure 2). La génération de la lignée cellulaire monoclonale TagRFP-CLDN1^{+/+} et EGFP-OCLN^{+/+} a été obtenue par dilution limite dans des plaques 96 puits et cultivée en utilisant un milieu correspondant à un ratio 1:1 de surnageant de culture cellulaire Huh7.5.1 filtré et de milieu complet frais, afin de stimuler la croissance des clones.

L'ADNg des lignées cellulaires monoclonales a été extrait par la solution d'extraction d'ADN QuickExtract (Lucigen). L'identification des clones doubles édités (^{+/+}) a été réalisée par amplification par PCR en utilisant GoTaq polymérase (Promega) et les amorces F_{gCLDN1} 5' - cggagctgctttaaactcgcg - 3' et R_{gCLDN1} 5' - ctgggcggtcacgatgtg - 3' pour l'édition TagRFP-CLDN1 (Figure 33A) et F_{gOCLN} 5' - gctaaagggcattgctcatcct - 3' et R_{gOCLN} 5' - aggtgacagcagttgtcctagc - 3' pour l'édition EGFP-OCLN (Figure 33B). Ces amorces flanquent la région autour du codon d'initiation de CLDN1 et d'OCLN et permettent de mettre en évidence l'insertion de la TagRFP et EGFP respectivement.

- L'amplification de CLDN1 non édité correspond à un produit de 409 paires de bases (pb), alors que l'insertion de TagRFP donne un produit de 1165 pb.

- L'amplification de l'OCLN non édité correspond à un produit de 310 pb, alors que l'insertion de l'EGFP donne un produit de 1054 pb.

Invalidation génique (Knock-out = KO)

Les cellules *HeK293T* ont étéensemencées dans des plaques 6 puits pour atteindre 50% de confluence le lendemain. Les cellules ont été co-transfectées à l'aide de JetPrime (Polyplus Transfection) selon les instructions du fabricant avec :

- 900 ng de plasmide lenti contenant la séquence codante de la protéine Cas9, de la protéine fluorescente iRFP670, de la puromycine et des ARN guides associés (Figure 41A) (plasmide matrice : Addgene # 122182) :
 - ARNg pour les KO-CLDN1 :
5'- gagcgagtcgatggccaacgc -3' et 5' – caacagctgcagccccgcgt – 3'
 - ARNg pour les KO-Ctrl (ciblant la luciférase firefly) :
5'- cttcgaaatgtccgttcggt -3' et 5' – cccggcgccattctatccgc – 3'
- 900 ng de plasmide codant pour gag/pol d'HIV et
- 300 ng de plasmide codant pour les protéines d'enveloppes de VSVG

Les lentivirus ont été récoltés 48 h et 72 h après transfection et centrifugés 10 min à 400 g pour éliminer les débris cellulaires.

Les lignées cellulaires invalidées génétiquement ont été incubées 24 h avec les lentivirus précédemment produits en présence de 1 µg/ml de Polybrene (EMD Millipore). Trois jours plus tard, les cellules ont été exposées à la puromycine (2 µg/ml) pendant une semaine pour la sélection, après quoi les survivantes ont été triées par Cytométrie en flux sur la base d'une expression élevée d'iRFP670. Le tri cellulaire activé par fluorescence (FACS) a été effectué sur un instrument FACSAria 2 (BD Biosciences) équipé d'un laser à 647 nm et d'une buse de 130 µm

La génération de la lignée cellulaire monoclonale Huh7.5.1 sauvage KO-CLDN1 et KO-Ctrl, ainsi que la lignée Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} KO-CLDN1 et KO-Ctrl a été obtenue par dilution limite dans des plaques 96 puits et cultivée en utilisant un milieu correspondant à un ratio 1:1 de surnageant de culture cellulaire Huh7.5.1 filtré et de milieu complet frais, afin de stimuler la croissance des clones.

Western blot (WB)

Les cellules sauvages, TagRFP-CLDN1^{+/+} et EGFP-OCLN^{+/+} ont été lysées sur la glace dans du tampon RIPA (Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes. Les débris cellulaires ont été éliminés des lysats par centrifugation à 10 000 g pendant 20 min à 4°C après laquelle les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes. La teneur en protéines dans les lysats a été mesurée à l'aide du kit de dosage des protéines Pierce BCA (ThermoFisher Scientific) conformément aux instructions du fabricant. Vingt microgrammes de chaque lysat ont été migrés sur gels de protéines dénaturantes 4%-12% NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen) dans des conditions non réductrices. Le transfert s'est effectué sur des membranes de nitrocellulose (Invitrogen) à l'aide d'un dispositif de transfert de gel iBlot2 (Invitrogen). Les membranes ont été bloquées pendant 1 heure à température ambiante en utilisant 5% de lait, 0,05% de Tween20 dans du PBS (Genaxxon Bioscience). Puis les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec un anticorps primaire dans 0,5% de lait et 0,05% de Tween20 dans du PBS. Les membranes ont été abondamment lavées avec du Tween20 à 0,05% dans du PBS et incubées pendant 2 h avec une solution contenant un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP). Les membranes ont été révélées par chimioluminescence en utilisant Clarity Western ECL blotting substrates (Bio-Rad) et les images ont été acquises en utilisant le ChemiDoc Touch system (Bio-Rad).

Cytométrie en flux (FACS)

Les cellules ont été détachées avec de la trypsine-EDTA (Gibco) ou de l'EDTA 10 mM (Invitrogen) lors de la détection de protéines membranaires et ont été centrifugées à 450 g pendant 5 min à température ambiante, puis lavées deux fois avec du PBS (Gibco) et fixées pendant 20 min à température ambiante dans 4 % de paraformaldéhyde (PFA). Les cellules en suspension ont été incubées dans du tampon de blocage/perméabilisation (0,1% de Triton X-100 et 0,5% de BSA dans du PBS) pendant 30 min à température ambiante. Les cellules ont été incubées avec des anticorps primaires à 4°C pendant 2 h, puis lavées et incubées avec des anticorps secondaires conjugués à des fluorophores dilués dans du tampon de blocage/perméabilisation pendant 45 min à température ambiante. Le pourcentage

de cellules positives et l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) ont été déterminés par cytométrie en flux en utilisant le Novocyte (ACEA) et les résultats ont été analysés en utilisant FlowJo (LLC) v10.

Quantification des ARNs (RT-qPCR)

L'ARN total a été isolé avec NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel), l'ADN complémentaire a été synthétisé avec iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-rad) selon les instructions du fabricant. La PCR quantitative a été réalisée avec iTaq Universal SYBR Green (bio-Rad) sur l'instrument Lightcycler 480 (Roche) avec les amorces spécifiques de CLDN1, SRB1, CD81, OCLN et GAPDH :

Amorces	Sens	Antisens
CLDN1	5'- TACTCCTATGCCGGCGACA -3'	5'- GACATCCACAGCCCCTCGT - 3'
SRB1	5'- TCGCAGGCATTGGACAAACT - 3'	5'- CTCCTTATCCTTTGAGCCCTTTT - 3'
CD81	5'- ACAAGGACCAGATCGCCAAG - 3'	5'- AGTCAAGCGTCTCGTGGAAG - 3'
OCLN	5'- AGGCGAAGTTAATGGAAGCTC - 3'	5'- ATGGCAAAGTGAATGACAAGC - 3'
GAPDH	5'- GAGTCAACGGATTTGGTCGT - 3'	5'- TTGATTTTGGAGGGATCTCG - 3'

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour la PCR quantitative

L'expression des gènes est montrée en niveau relatif d'expression des ARN messager (ARNm) normalisé par le gène de ménage GAPDH.

Transfection

Le plasmide mCherry-CaaX (Addgene # 108886) a été transfecté à l'aide de Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific) conformément aux instructions du fabricant.

Immunofluorescence (IF) et imagerie des échantillons fixés

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre (Electron Microscopy Sciences) dans des plaques à 24 puits pendant 48 h.

Conditions expérimentales spécifiques :

- Figure 48A : Cellules incubées avec du HCVcc-A647 dans du milieu complet, lavées et fixées à différents temps post-infection

- Figure 48B : Cellules incubées avec des FluoSpheres Microspheres de 0.04 μm (660/680) (ThermoFisher Scientific) diluées au 1/10000^{ème} dans du milieu complet, lavées et fixées à différents temps post-addition

Les cellules ont été fixées pendant 20 min à température ambiante dans 4% de PFA. Les lamelles ont été incubées dans du tampon de blocage/perméabilisation (0,5% de BSA et 0,1% de Triton X100 dans du PBS) pendant 30 min à température ambiante et des anticorps primaires ont ensuite été ajoutés pendant 2 h à température ambiante. Après lavage, les lamelles ont été incubées avec des anticorps secondaires conjugués à des fluorophores dilués dans du tampon de blocage/perméabilisation pendant 45 min à température ambiante. Le Dapi a été ajouté 5 min avant le lavage des lamelles et leur montage en utilisant un milieu de montage aqueux Fluoromount (Sigma-Aldrich). L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope inversé Z1 (Nikon) équipé d'une tête de disque en rotation CSU-X1 (Andor), d'une caméra EMCCD iXon897 (Andor) et d'un objectif à huile X100 Plan Apo lambda 1.45 NA (Nikon) contrôlé par le logiciel iQ3 (Instrument d'Oxford Andor). Les images ont été analysées avec Imaris v.9.2 (Bitplane) ou la version Fiji de ImageJ.

Imagerie sur cellules vivantes

Les cellules ont été cultivées sur une lamelle de verre de 30 mm de diamètre (Lordil) dans des plaques à 6 puits pendant 48 h.

Lignée cellulaire	TagRFP-CLDN1 ^{+/+}	EGFP-OCLN ^{+/+}
Incubation réalisée avant l'imagerie en temps réel	Incubation avec du Draq5 (Fisher Scientific) conformément aux instructions du fabricant dans un milieu Fluorobright (Gibco) additionné de 2% de FBS (Sigma-Aldrich). (Figure 38C)	Incubation avec 300 μL d'HCVcc-A647 dans un milieu Fluorobright (Gibco) supplémenté de 2% de FBS (Sigma-Aldrich). (Figure 52 et 53)

Tableau 6 : Traitement des lignées cellulaires avant imagerie en temps réel

L'acquisition des images a été réalisée à 37°C et 5% CO₂ dans une chambre noire à l'aide d'un microscope inversé AxioObserver.Z1 (Zeiss) muni d'une tête à

disque rotatif (Yokogawa), d'une caméra EMCCD rétro-éclairée (Evolve, Photometrics) et d'un objectif à huile X100, 1,45 NA (Zeiss), contrôlée par le logiciel Visiview v.3.3.0 (Systèmes Visitron).

Récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)

Les cellules ont été cultivées sur une lamelle de verre de 30 mm de diamètre (Lordil) dans des plaques 6 puits pendant 48 h. Les expériences FRAP ont été effectuées sur un vidéomicroscope iMIC (Till Photonics) équipé d'un laser Cobolt Dual Calypso 491/532 nm (Solna) et d'un objectif à huile Olympus 60x TIRFM (1,45 NA). Au cours de l'acquisition, les cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ en utilisant un système de contrôle de l'environnement (Life Imaging Services). Les images enregistrées avant et après le blanchiment ont été acquises avec une source de lumière Spectra X sur une caméra CMOS ORCA-Flash 4 (Hamamatsu). Une région d'intérêt à photoblanchir de 3,36 µm a été définie. Après photoblanchiment, des images ont été acquises toutes les 2,5 s pour surveiller la récupération de la fluorescence durant 310 s. Expériences réalisées dans le laboratoire de Yves Mély.

Analyse d'image

Le traitement et la quantification d'image de la colocalisation entre HCV et OCLN au niveau ou à l'extérieur des TJ ont été effectués à l'aide de la version Fiji d'ImageJ.

Une soustraction du bruit de fond utilisant un rayon de roulement de 100 pixels pour OCLN et de 20 pixels pour HCV a été appliquée sur toutes les images afin d'homogénéiser les signaux. Le nombre et la localisation des signaux du VHC ont été mesurés à l'aide de l'outil « *analyze particle* » de ImageJ, en ne prenant en compte que les particules de 5 à 40 pixels (pour éliminer les taches de fond et les agrégats). Le masque obtenu a été utilisé pour quantifier le pourcentage de particules contenant de l'OCLN. Ensuite, les signaux continus d'OCLN (correspondant aux TJs) ont été suivis manuellement pour quantifier le nombre de particules de VHC au niveau de ces TJs. Le nombre de particules du VHC en dehors

des TJ a été calculé en soustrayant le nombre de particules aux TJs au nombre total de particules positives pour l'OCLN (Figure 32).

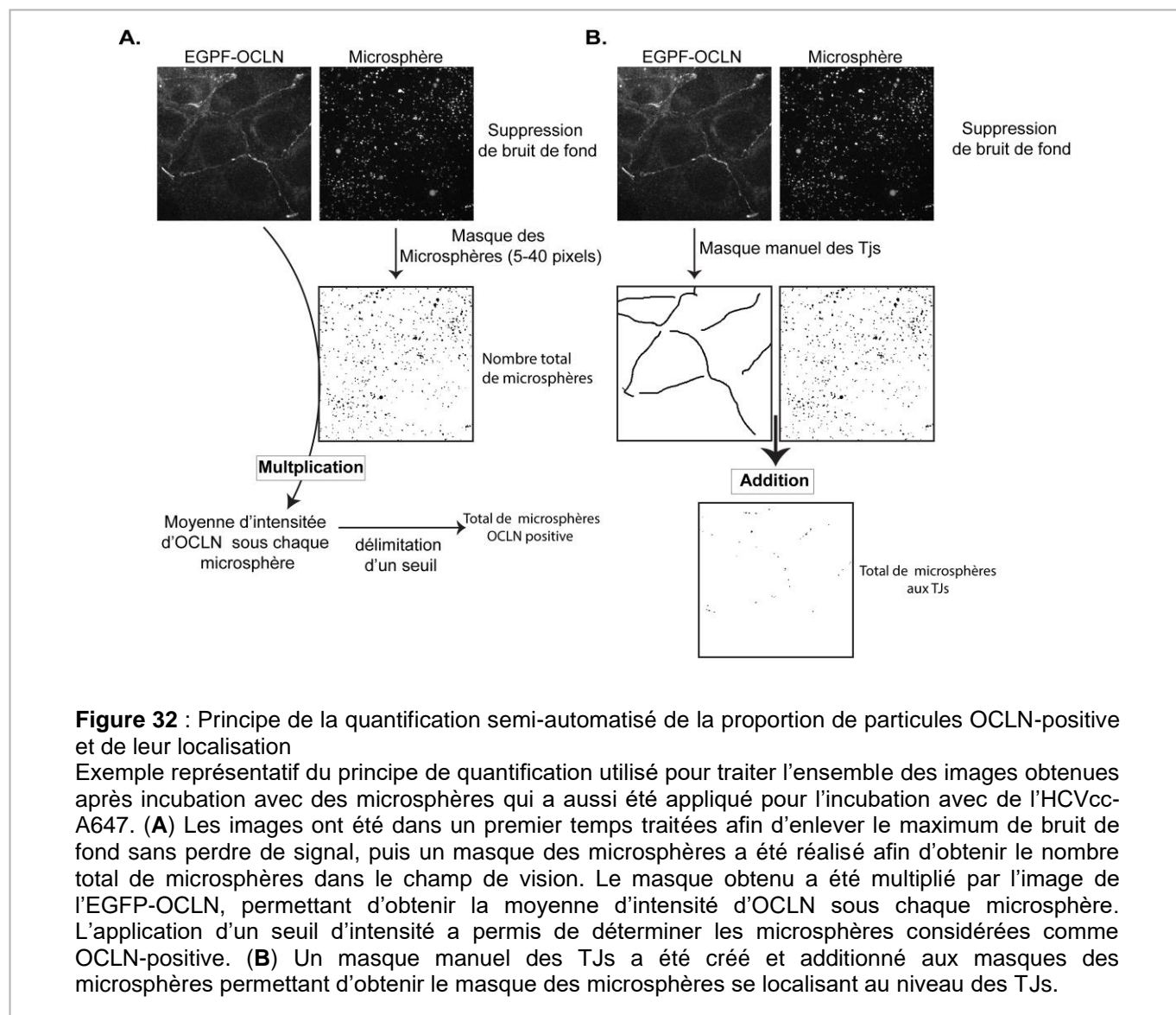


Figure 32 : Principe de la quantification semi-automatisée de la proportion de particules OCLN-positives et de leur localisation

Exemple représentatif du principe de quantification utilisé pour traiter l'ensemble des images obtenues après incubation avec des microsphères qui a aussi été appliqué pour l'incubation avec de l'HCVcc-A647. (A) Les images ont été dans un premier temps traitées afin d'enlever le maximum de bruit de fond sans perdre de signal, puis un masque des microsphères a été réalisé afin d'obtenir le nombre total de microsphères dans le champ de vision. Le masque obtenu a été multiplié par l'image de l'EGFP-OCLN, permettant d'obtenir la moyenne d'intensité d'OCLN sous chaque microsphère. L'application d'un seuil d'intensité a permis de déterminer les microsphères considérées comme OCLN-positives. (B) Un masque manuel des TJs a été créé et additionné aux masques des microsphères permettant d'obtenir le masque des microsphères se localisant au niveau des TJs.

Les analyses d'imagerie sur cellules vivantes ont été effectuées sur Bitplane Imaris v9.2. La dynamique des particules du VHC a été mesurée par un suivi automatique dans le temps, basé sur un seuil d'intensité absolue. Le signal d'OCLN correspondant a été extrait et le suivi des films quantifiés a été vérifié manuellement pour exclure les potentielles pistes non interprétables ou faussées.

Toutes les images d'une expérience ont été acquises en utilisant la même puissance laser et le même temps d'exposition pour chaque canal. Le traitement du contraste pour la représentation visuelle est resté identique pour les différentes conditions d'une même expérience. Pour la quantification, le seuil du signal

fluorescent a été maintenu identique pour les différentes conditions au sein d'une même expérience.

Test de perméabilité

Les cellules ont été cultivées pendant 4 jours sur l'insert du *transwell* composé d'une membrane de polyester avec des pores de 0,4 µm (Corning) disposé dans une plaque de 24 puits.

Le TEER a été mesuré en utilisant un voltohmmètre épithélial EVOM2 et des électrodes STX3 plongeant simultanément dans la chambre supérieure du *transwell* pour l'une et l'inférieure pour l'autre. Les valeurs de TEER rapportées en Ω / cm² correspondent à la surface de l'insert du *transwell* multipliée par la résistance mesurée (Ω).

Le test de perméabilité basé sur la fluorescence, les cellules cultivées dans les *transwell* ont été incubées avec du réactif jaune Lucifer 50 µM (Merck) pendant 2 h à 37 °C et les milieux à partir des chambres inférieures et supérieures ont été recueillis. La quantification de la fluorescence a été réalisée en utilisant un lecteur de microplaques multimode Mithras LB 940 (Berthold Technologies) avec une excitation à 488 nm et une émission à 520 nm. En parallèle, une courbe d'étalonnage a été préparée en utilisant des concentrations de Lucifer yellow de 50, 25, 12,5 ou 6,25 µM. Le coefficient de perméabilité (Pc) a été calculé comme suit :

$$Pc = \frac{V \text{ chambre inférieure}}{\text{Surface du transwell} \times Ci \text{ l'insert}} \times \frac{Cf \text{ chambre inférieure}}{\text{Temps}}$$

V : volume

Ci : Concentration initiale

Cf : Concentration final

Production d'HCVpp et VSVpp

Les cellules Hek 293T ont étéensemencées dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre et ont été transfectées le lendemain à l'aide du kit de phosphate de calcium (Ozyme) avec trois vecteurs d'expression. Le premier vecteur codant pour

les protéines rétrovirales Gag et Pol, le deuxième vecteur codant pour une protéine rapportrice (luciférase firefly) entre les séquences LTR du VIH et le troisième vecteur codant pour les protéines de l'enveloppe du VHC (E1 et E2) provenant de la souche chimérique Jc1 ou de l'enveloppe du VSV-G. Les surnageants viraux ont été recueillis 24 h et 48 h post-transfection, puis filtrés à travers un filtre de 0,45 µm pour éliminer les débris cellulaires et stockés à 4°C ou -20°C pour une conservation longue.

Production d'HCVcc

Les ARN complets de HCVcc Jc1-Luc (Luc : luciférase firefly) et HCVcc Jc1^{FLAG-E2} ont été générés à partir d'un plasmide matrice en utilisant le kit de transcription Megascript T7 (Thermo Fisher Scientific) conformément aux instructions du fabricant.

Des cellules Huh7.5.1 (4×10^6) ont été électroporées avec 5 µg d'ARN de HCV dans une solution d'électroporation Ingénio (Mirus) en utilisant le programme T-001 d'Amaxa Nucleofector (Lonza). Les surnageants ont été recueillis toutes les 48 h pendant 6 à 8 passages après l'électroporation, puis centrifugés à 450 g pendant 5 min et conservés à 4°C ou -80°C pour un stockage prolongé. Les surnageants précédemment récoltés ont été concentrés 6 à 10 fois sur des concentrateurs Vivaspinn 20 avec une valeur seuil de 100 kDa (Sartorius) et conservés à 4°C ou à -80°C pour une conservation longue.

Titration par détection de l'activité luciférase

Des cellules Huh7.5.1 ont étéensemencées dans une plaque 96 puits et infectées le lendemain avec 50 µL de virus (HCVcc Jc1-Luc, HCVpp Jc1 ou VSVpp). Trois jours après l'infection, les cellules ont été lysées en utilisant un tampon Glo Lysis (Promega) et le lysat a été mélangé à un volume équivalent du système de dosage ONE-Glo luciférase (Promega). La quantité d'activité luciférase a été mesurée avec l'instrument Infinite F200 Pro (Tecan). Les valeurs ont été exprimées en unités relatives de luciférase (RLU).

Titration par détection de l'activité luciférase

Des cellules Huh7.5.1 ont étéensemencées dans une plaque 24 puits (Corning) et infectées le lendemain avec divers volumes de HCVcc Jc1^{FLAG-E2} (de 2 à 20 µL). Trois jours après l'infection, le pourcentage de cellules infectées a été déterminé par cytométrie en flux en utilisant un anticorps anti-NS5a sur le Novocyte (ACEA). Les résultats ont été analysés avec FlowJo V10 (LCC).

L'unité infectieuse FACS par mL a été calculée comme suit :

$$\frac{\% \text{ de cellules infectées} \times \text{nombre de cellules ensemencés} \times \text{facteur de dilution}}{\text{Volume de l'inoculum}}$$

Purification et marquage de particules de HCVcc Jc1^{FLAG-E2}

La préparation virale concentrée HCVcc Jc1^{FLAG-E2} a été incubée avec un gel d'affinité anti-Flag M2 (Sigma-Aldrich) pendant 2 h à température ambiante. Le gel a été centrifugé à 500 g pendant 2 min, puis lavé cinq fois avec du PBS contenant du calcium et du magnésium (Gibco). Le virus lié à la résine a été élué à l'aide de peptide Flag (Sigma-Aldrich) à 100 µg/ml. L'éluion a été réalisée avec du NaHCO₃ 1 M dans un rapport de 1:10 et incubée avec de l'ester Alexa Fluor 647 NHS (Thermofisher Scientific) ou un volume égal de DMSO (Sigma-Aldrich) pendant 1 h à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec une agitation douce toutes les 15 min. L'excès de colorant a été éliminé par lavages OptiMEM (Gibco) en utilisant le concentrateur Pierce, avec une valeur seuil de 10 kDa (Thermofisher Scientific) et stocké à -80°C.

Test d'infection en fonction du temps

Cette expérience a été réalisé par nos collaborateurs (Pablo Gastaminza, CNB, Espagne). Les cellules Huh7.5.1 ont été inoculées avec des dilutions en série de stock de virus JFH-1 dans du DMEM à 10% de FCS. Les surnageants ont été retirés aux heures indiquées et les cellules ont été réincubées avec du milieu pendant 72 h. Les cellules ont ensuite été fixées et traitées pour la microscopie par immunofluorescence et la numération des cellules infectées, en utilisant un anticorps monoclonal anti-E2 recombinant, comme indiqué précédemment (Zhong et al. 2005).

Purification d'HCVcc par ultracentrifugation en coussin de sucrose

La préparation virale concentrée HCVcc Jc1-Luc a été délicatement ajoutée sur un coussin de sucrose de 20% et ultracentrifugée à 30 000 rpm pendant 4 h à 4°C sous vide. Après élimination du surnageant le culot de particules virales est re-suspendu dans 100µL d'OptiMEM (Gibco) et conservé à 4°C avant utilisation pour les tests d'infectivité.

Inhibition de l'infection par le VHC

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits pendant 24 h. Le lendemain les cellules ont tout d'abord été prétraitées avec les inhibiteurs dilués dans de l'OptiMEM (GIBCO) pendant 30 min, puis incubées avec les inhibiteurs dilués et de l'HCVcc (souche Jc1-Luc) purifié (sur gradient de sucrose) pendant 3 h. Au terme de l'incubation les surnageants ont été retirés et les cellules ont été lavées avec du PBS (GIBCO) afin de retirer les particules virales non attachées. Les cellules ont été réincubées avec du milieu complet pendant 72 h, sauf pour le sofosbuvir où le traitement a été prolongé sur les 72h. Les cellules ont alors été lysées en utilisant un tampon Glo Lysis (Promega) et le lysat a été mélangé à un volume équivalent du système de dosage ONE-Glo luciférase (Promega). La quantité d'activité luciférase a été mesurée avec l'instrument Infinite F200 Pro (Tecan). Le pourcentage d'infection a été déterminé par le ratio de la luminescence entre les cellules non-traitées et les cellules traitées. La cytotoxicité des inhibiteurs dans ces conditions expérimentales a été évaluée à l'aide du Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (ThermoFisher Scientific) conformément aux instructions du fabricant.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données ont été effectuées à l'aide de T-test bilatéral (*two-tailed unequal variance Student t-tests*) (ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$), les moyennes et les écarts types ont été tracés en utilisant Prism. Le nombre d'expériences indépendantes est indiqué dans chaque légende de figure.

RESULTATS

RESULTATS PREMIERE PARTIE

Génération des outils biologiques pour l'imagerie en temps réel

L'imagerie de cellule vivante par microscopie à fluorescence est un outil puissant pour étudier des événements dynamiques d'entrée virale. Mais une détection efficace nécessite le marquage des virus et des composants cellulaires étudiés. Ce marquage se fait majoritairement par le biais de sondes fluorescentes et/ou de cellule exprimant des protéines en fusion à des étiquettes fluorescentes. Les sondes, comme les protéines de fusion utilisées ne doivent pas altérer l'infectiosité virale et les fonctions cellulaires. De plus, il faut noter que lors de l'expression de protéines de fusion, l'expression de la protéine endogène persiste entraînant la présence de protéines « fantômes » non fluorescentes.

1. Génération de lignées éditées Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1 et EGFP-OCLN

Des cellules Huh7.5.1 (isolées d'un hépatocarcinome humain) ont été génétiquement modifiées à l'aide du système CRISPR/Cas9, afin d'éviter la surexpression des récepteurs du VHC qui pourrait impacter les fonctions cellulaires. Cette stratégie a permis la génération de deux lignées cellulaires monoclonales éditées exprimant EGFP-OCLN^{+/+} ou TagRFP-CLDN1^{+/+}.

Pour cela une séquence codant pour la protéine fluorescente TagRFP-T (Shaner et al. 2008) et l'EGFP (Cinelli et al. 2000) a été insérée au niveau du codon d'initiation du gène codant respectivement pour la CLDN1 et l'OCLN, suivie d'une séquence codante GGSGGSGGS pour lier de manière flexible les étiquettes aux protéines cibles (Figure 33 A-B). Les cellules ont été transfectées avec un plasmide codant pour la protéine spCas9, un produit PCR codant l'ARN guide ciblant la région ATG du gène *cldn1* ou *ocln* sous le contrôle du promoteur U6 humain et d'un plasmide « donneur » fournissant la matrice d'ADN nécessaire à la recombinaison homologue. Ce plasmide donneur contient la séquence de l'étiquette fluorescente

choisie (TagRFP ou EGFP) suivie de son linker, cette séquence codante est flanquée en amont et en aval de la séquence d'ADN génomique du gène cible (les 800 nucléotides avant et après le site d'insertion choisit sur le gène cible : ici l'ATG) (Figure 33C).

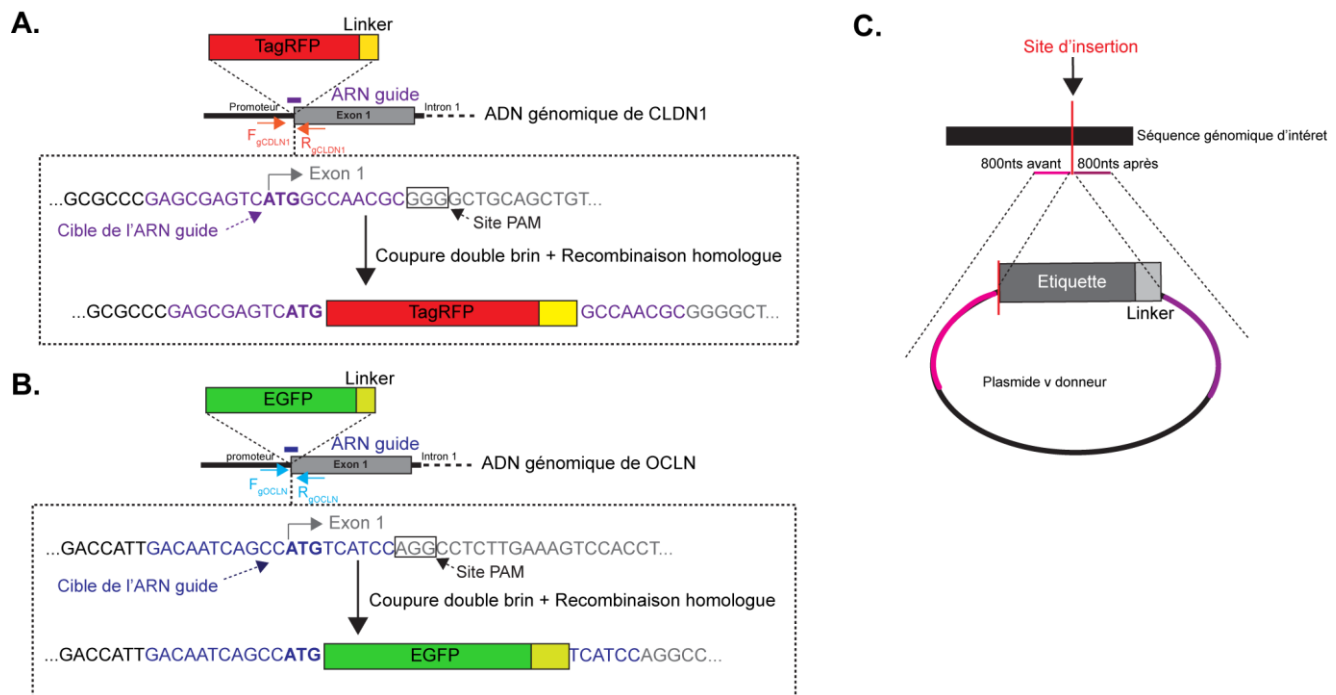


Figure 33 : Génération des lignées Huh 7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} et EGFP-OCLN^{+/+} par ingénierie CRISPR/Cas 9.

Schémas représentatifs de la stratégie d'insertion des étiquettes fluorescentes dans le génome d'Huh7.5.1. **(A)** Insertion de la séquence TagRFP-linker (boîte rouge et jaune) au niveau du codon initiateur du gène de la *cldn1* en utilisant la spécificité de reconnaissance de l'endonucléase CRISPR/Cas9. **(B)** Insertion de la séquence EGFP-linker (boîte vert foncé et pale) au niveau du codon initiateur du gène de l'*ocln* en utilisant la spécificité de reconnaissance de l'endonucléase CRISPR/Cas9. **(A et B)** La séquence complémentaire à l'ARN guide est représentée respectivement en violet et en bleu foncé, la séquence PAM reconnue par l'endonucléase est encadrée en noir (NGG = GGG et AGG). Les amorces utilisées pour la vérification de l'édition génomique des clones cellulaires sont représentées en rouge pour TagRFP-CLDN (F_{gCLDN1} et R_{gCLDN1}) et en bleu clair pour EGFP-OCLN (F_{gOCLN} et R_{gOCLN}) respectivement et entourées en noir. **(C)** Représentation schématique du plasmide donneur utilisé lors de la stratégie d'édition.

La transcription de l'ARN guide et la traduction de la protéine Cas9 va permettre la formation du complexe ribonucléoprotéique dans le noyau. Le complexe ribonucléoprotéique parcourt le génome à la recherche de séquence PAM (*protospacer adjacent motif*) NGG, si celle-ci se trouve au niveau de la séquence cible, il y a hybridation de l'ARNg et clivage double brin du génome. La machinerie de réparation cellulaire, peut alors par recombinaison homologue réparer la cassure

double brin générée par Cas9 soit à l'aide du second allèle soit à l'aide du plasmide donneur. Dans le second cas, cela entraîne l'insertion de la TagRFP ou l'EGFP en 5' du gène d'intérêt (*cldn1* ou *ocln*) (Figure 33A-B).

Après transfection, l'absence de pression de sélection rend transitoire l'expression de ces différentes constructions dans les cellules réduisant l'efficacité d'édition mais empêchant toute invalidation génétique ou l'édition de gène non ciblé (*off target*) par la suite.

La sélection de lignées clonales pour ces deux constructions a été réalisé par des tris cellulaires successifs afin d'augmenter la proportion de cellules éditées au sein du pool de cellules transfectées et obtenir 50-70% de cellules exprimant la protéine fluorescente. Une lignée monoclonale doublement éditée a ensuite été isolée pour chacune des constructions nommées respectivement : Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} et TagRFP-CLDN1^{+/+}. Des expériences de Cytométrie en flux ont permis de suivre l'évolution de la fluorescence au sein des différentes populations obtenues aux cours des tri-cellulaires (Exemple pour la population TagRFP-CLDN1 en (Figure 34).

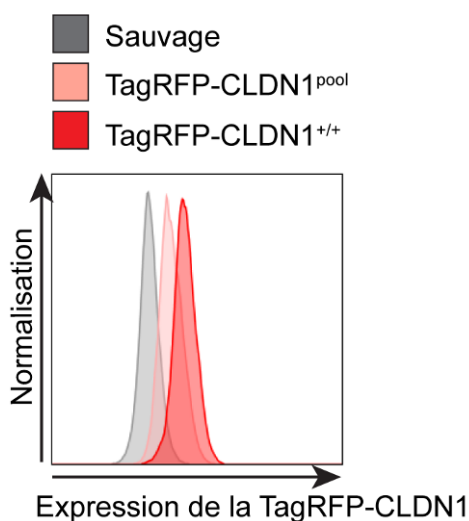


Figure 34 : Expression de la TagRFP dans les différentes populations de cellules éditées.

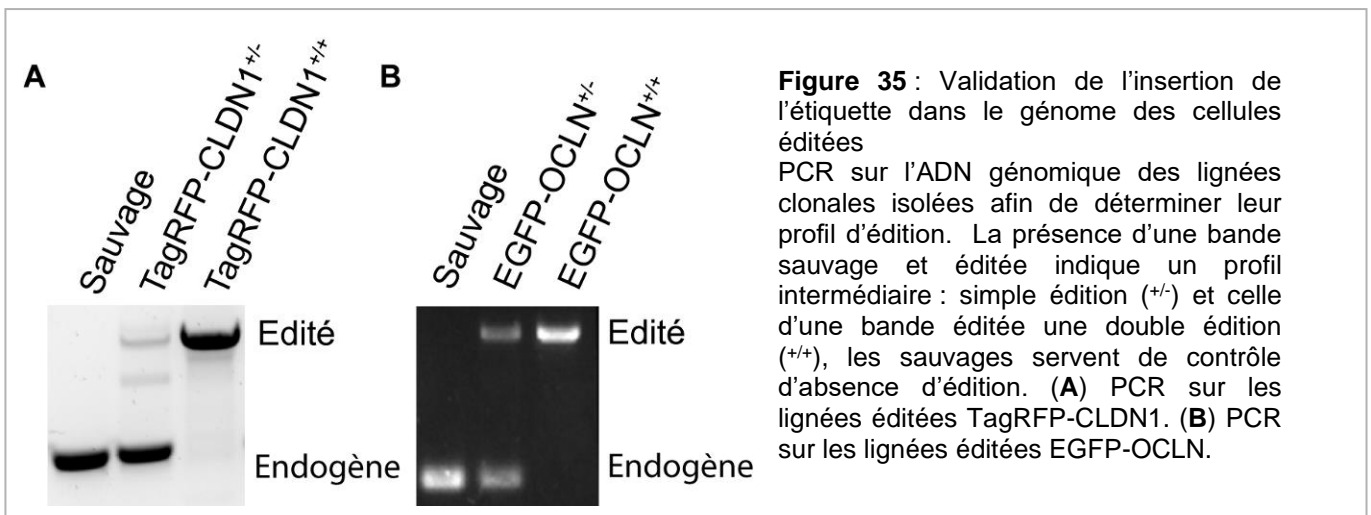
Histogramme représentatif de la différence d'expression de la TagRFP dans les cellules en fonction de leur stade d'isolation TagRFP-CLDN1^{pool}, représente les cellules éditées après leur second tri, TagRFP-CLDN1^{+/+} représente la population monoclonale doublement éditée sélectionnée. La population sauvage sert de contrôle négatif de l'expression de la TagRFP.

a) Validation de l'édition

Une fois que des populations monoclonales pour nos deux protéines d'intérêt ont été isolées, l'insertion de la TagRFP ou de l'EGFP au niveau des gènes cibles a été vérifié par PCR sur leur ADN génomique à l'aide d'amorces modélisées en amont et aval du site d'insertion (Figure 1A-B). Ces PCR ont permis de déterminer le profil d'édition des lignées clonales isolées : non éditées (sauvage), éditées sur un seul allèle (simple éditées ou $^{+/-}$) et éditées sur les deux allèles (double éditées ou $^{+/+}$).

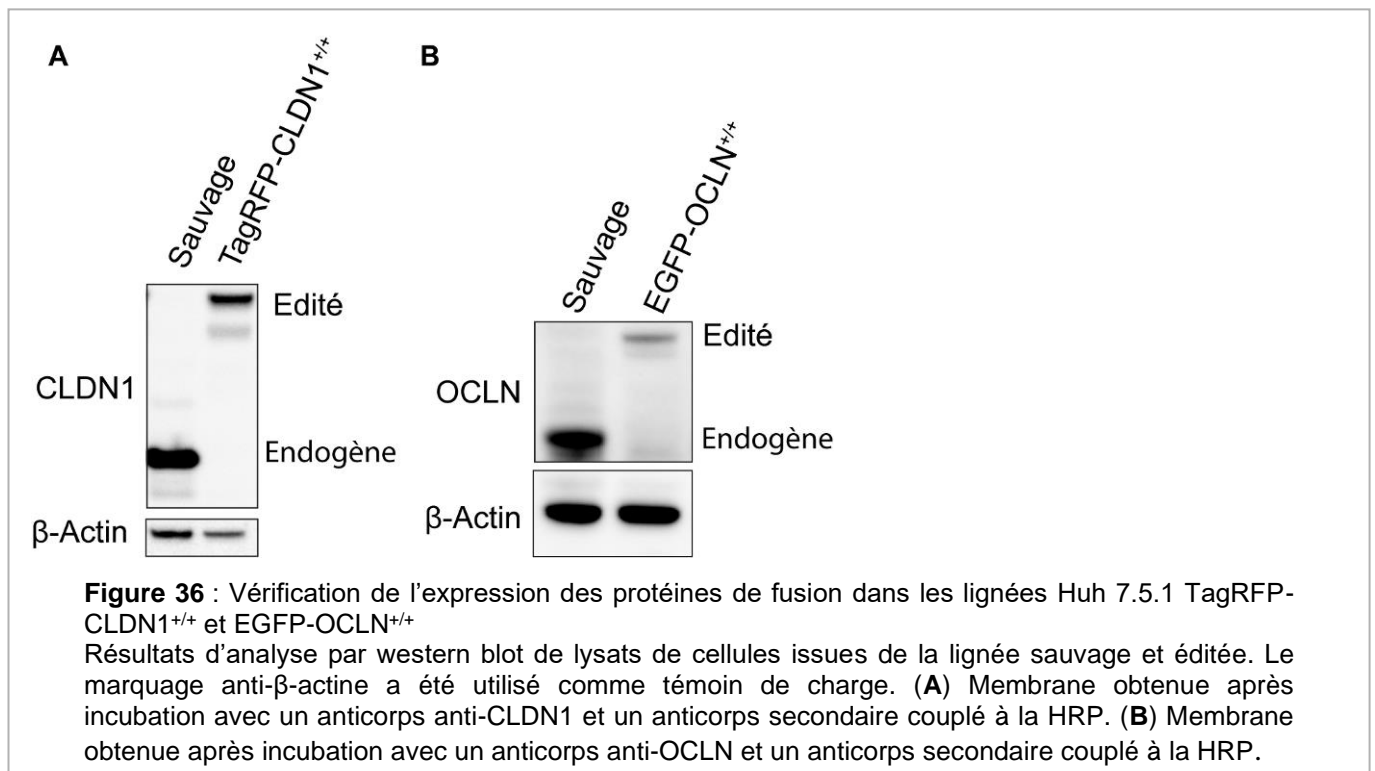
En absence d'édition, la PCR révèle l'amplification d'un petit fragment d'ADN. Dans le cas d'une édition réussie, l'ADN amplifié correspondant à l'amplification de la zone d'insertion avec l'étiquette insérée augmentant sa taille. Trois profils de PCR peuvent apparaître lors du criblage des populations clonales, une bande de petite taille correspond à une population sauvage, deux bandes, l'une petite et l'autre grande correspondent à une population simple éditée et pour finir une grande bande unique correspond à une population double éditée.

L'amplification de l'ADN génomique de lignées non éditées donne un fragment de respectivement 409 pb et 310 pb pour le criblage des clones TagRFP-CLDN1 (Figure 35A) et EGFP-OCLN correspondant à la forme endogène (Figure 35B), tandis que l'insertion de la TagRFP entraîne l'amplification d'un fragment de 1165 pb et celle de l'EGFP de 1054 pb correspondant à la forme endogène (Figure 35A-B).



Cependant l'insertion de la séquence de l'étiquette au sein du génome de la cellule ne signifie pas que la protéine de fusion en découlant est produite.

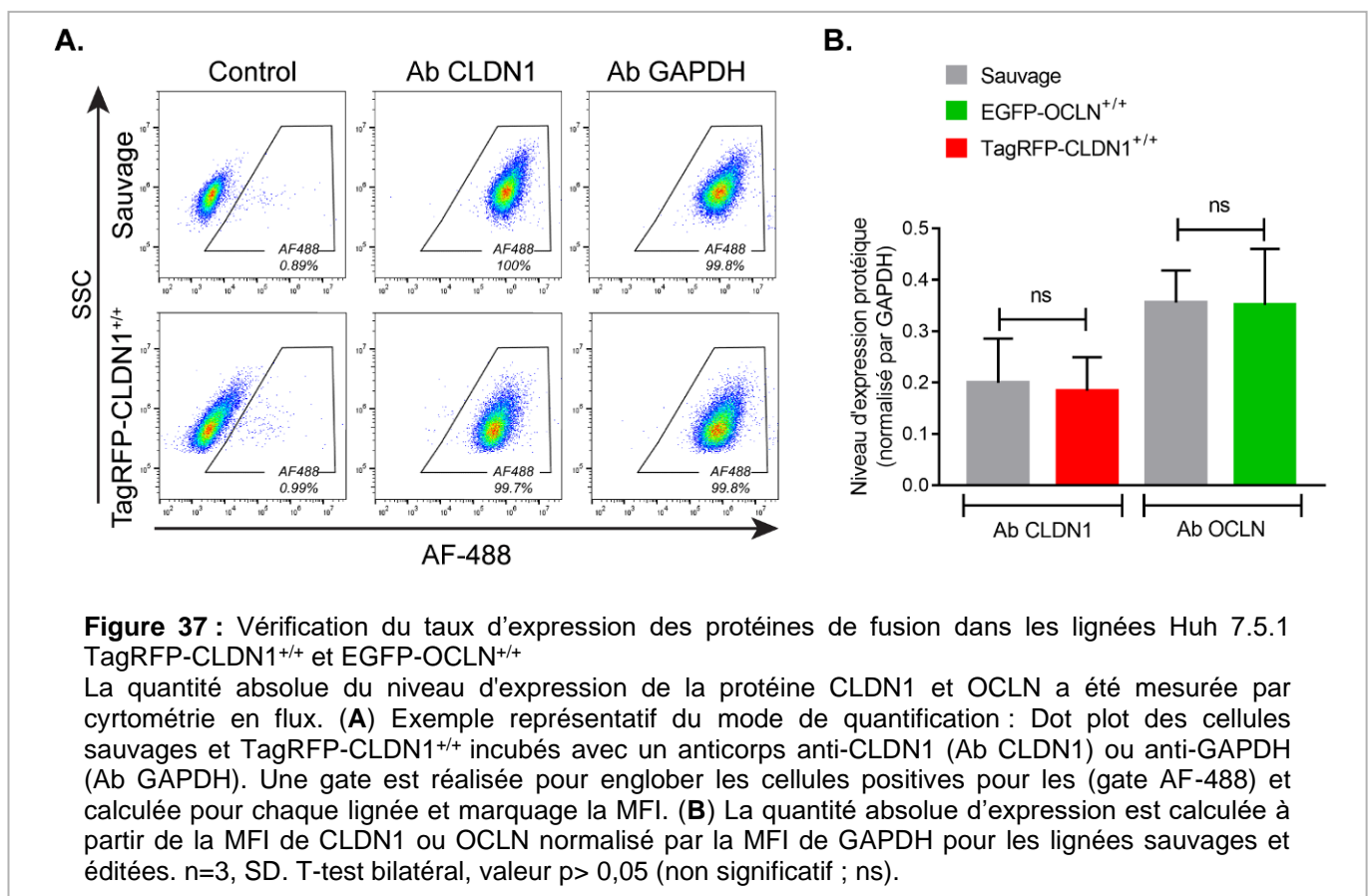
L'expression des protéines de fusion TagRFP-CLDN1 et EGFP-OCLN dans les lignées sélectionnées a alors été vérifiée par WB. La présence de l'étiquette dans la protéine augmente son poids moléculaire (molecular weight: MW) qui va correspondre à l'addition du MW de la protéine et de celui de son étiquette. En effet, l'édition de CLDN1 et d'OCLN entraîne une augmentation de la masse moléculaire détectée par WB, qui passe ≈ 22 kDa (Endogène) à 49 kDa pour la TagRFP-CLDN1 (Edité) (Figure 36A) et de ≈ 59 kDa (Endogène) à 87 kDa pour EGFP-OCLN (Edité) (Figure 36B).



On peut observer une diminution du taux d'expression des protéines dans les cellules éditées comparé aux cellules sauvages (Figure 36A-B). Cette première expérience semble indiquer que l'insertion des étiquettes impacte le taux d'expression. Cependant, les protéines de hautes masses moléculaires ne transfèrent pas avec la même efficacité que celle de masse moléculaire plus basse. Afin de déterminer si c'est l'étiquette qui impacte l'expression des protéines ou s'il s'agit d'une limite expérimentale propre à la technique de WB, une seconde quantification a été réalisée.

Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-CLDN1 ou anti-OCLN et l'intensité moyenne de fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux (Figure 37A). Aucune différence significative n'a été détectée dans le taux d'expression des protéines CLDN1 ou OCLN entre les cellules sauvages et éditées (Figure 37B).

Les étiquettes TagRFP et EGFP ont pu être insérées avec succès par bio-ingénierie en N-terminal des protéines CLDN1 et OCLN respectivement. Cette technique a permis d'obtenir deux lignées cellulaires TagRFP-CLDN1^{+/+} et EGFP-OCLN^{+/+} exprimant les protéines de fusions fluorescentes TagRFP-CLDN1 et EGFP-OCLN à un niveau endogène sans présence de protéines « fantômes » non fluorescentes. Il est ensuite nécessaire de vérifier que ces insertions n'influent pas sur la localisation et la fonctionnalité de ces protéines pour valider leur utilisation en imagerie en temps réel.



b) Caractérisation de l'influence de l'édition sur la localisation des protéines

OCLN et CLDN1 sont des protéines transmembranaires composant les TJs, afin de vérifier la localisation des protéines de fusion un marqueur des TJs ZO1 a été utilisé (Figure 38A). L'IF réalisée sur une monocouche cellulaire de cellules sauvages et éditées a montré que la protéine TagRFP-CLDN1 se localise au niveau des TJs, elle colocalise avec le marquage de l'OCLN (Ab OCLN Figure 38B). Cependant la fluorescence de TagRFP-CLDN1 est relativement faible lorsque les échantillons sont fixés, probablement à cause des procédures de fixation, de perméabilisation et de coloration. En effet, par imagerie sur cellules vivantes, on peut observer que le signal de fluorescence de la TagRFP-CLDN1 est plus fort et qu'il se distribue très distinctement aux TJs (Figure 38C).

Dans le cas de la lignée EGFP-OCLN^{+/+} la procédure de traitement ne semble pas impacter le signal de fluorescence, on peut observer une nette colocalisation entre l'EGFP-OCLN et le marquage ZO1 (Ab ZO1 Figure 38D).

L'insertion des étiquettes EGFP et TagRFP en amont des protéines OCLN et CLDN1 n'affecte pas leur distribution au niveau des TJs, de plus un marquage de l'Ezrin (Ab Ezrin Figure 38B-D) nous permet de visualiser le degré de polarisation de nos lignées cellulaires. L'Ezrin est une protéine faisant partie du complexe ERM (Ezrin, myosin et radixin) jouant un rôle dans l'organisation du cytosquelette (Figure 38A). La reconstitution 3D permet de visualiser en x, y et z les images d'IF. Le marquage d'Ezrin à la membrane apicale et le DAPI du noyau permet de visualiser la hauteur des TJs des cellules éditées et met en évidence que celles-ci sont plus proches du pôle apical que du pôle basal (Figure 38F-G). Le marquage membranaire des cellules EGFP-OCLN^{+/+} à l'aide d'une construction mCherry-CaaX, montre une position des TJs au niveau apical des jonctions cellule-cellule confirmant la polarisation apico-basolatérale des cellules Huh7.5.1 (Figure 6 G-H). Il faut noter que ce phénotype polarisé n'a pas été trouvé uniformément sur la lamelle, mais sous forme de plage de cellules polarisées.

On peut conclure que l'insertion des étiquettes n'impacte ni la localisation des protéines CLDN1 et OCLN ni la polarisation apico-basale des cellules.

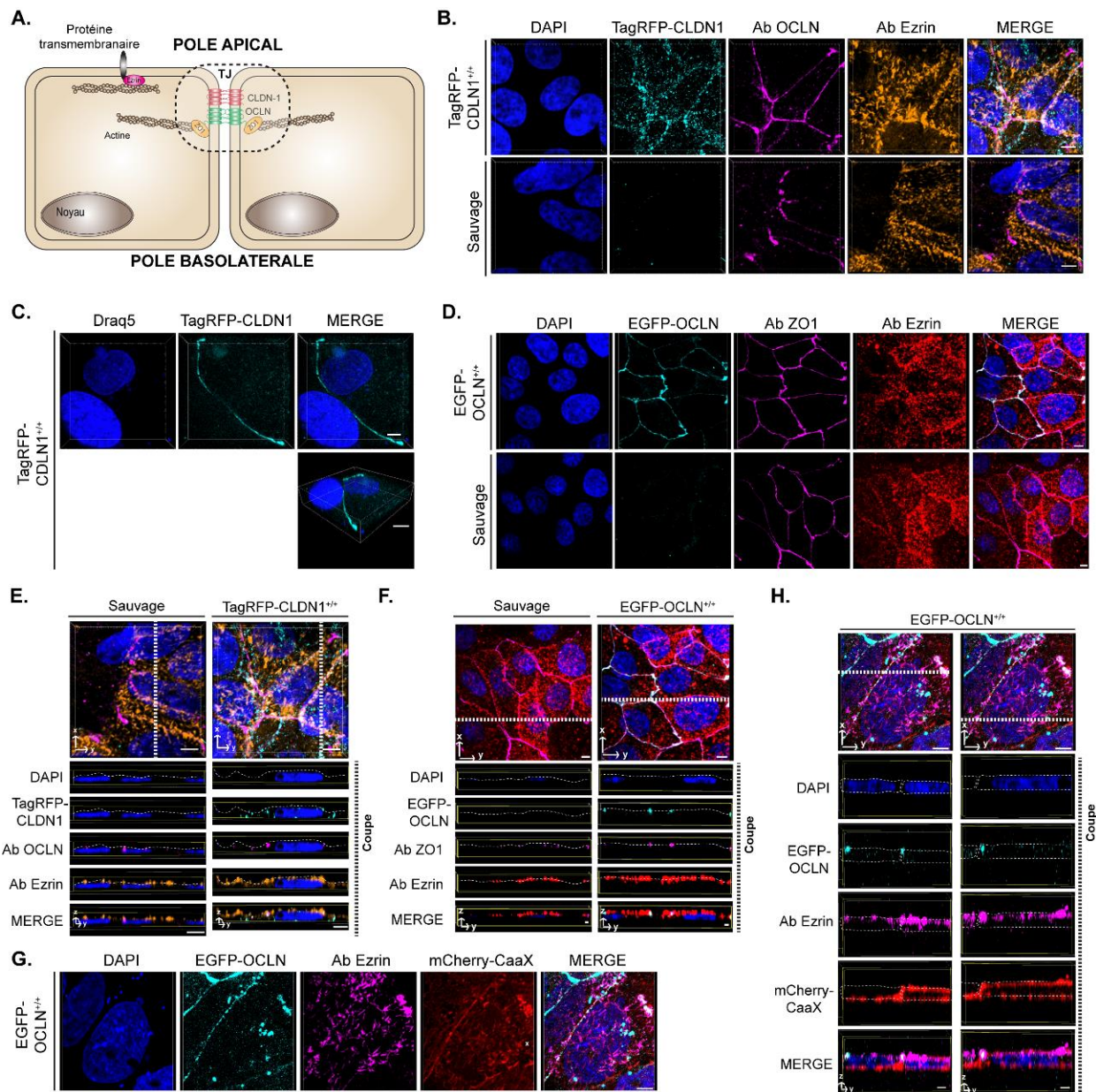
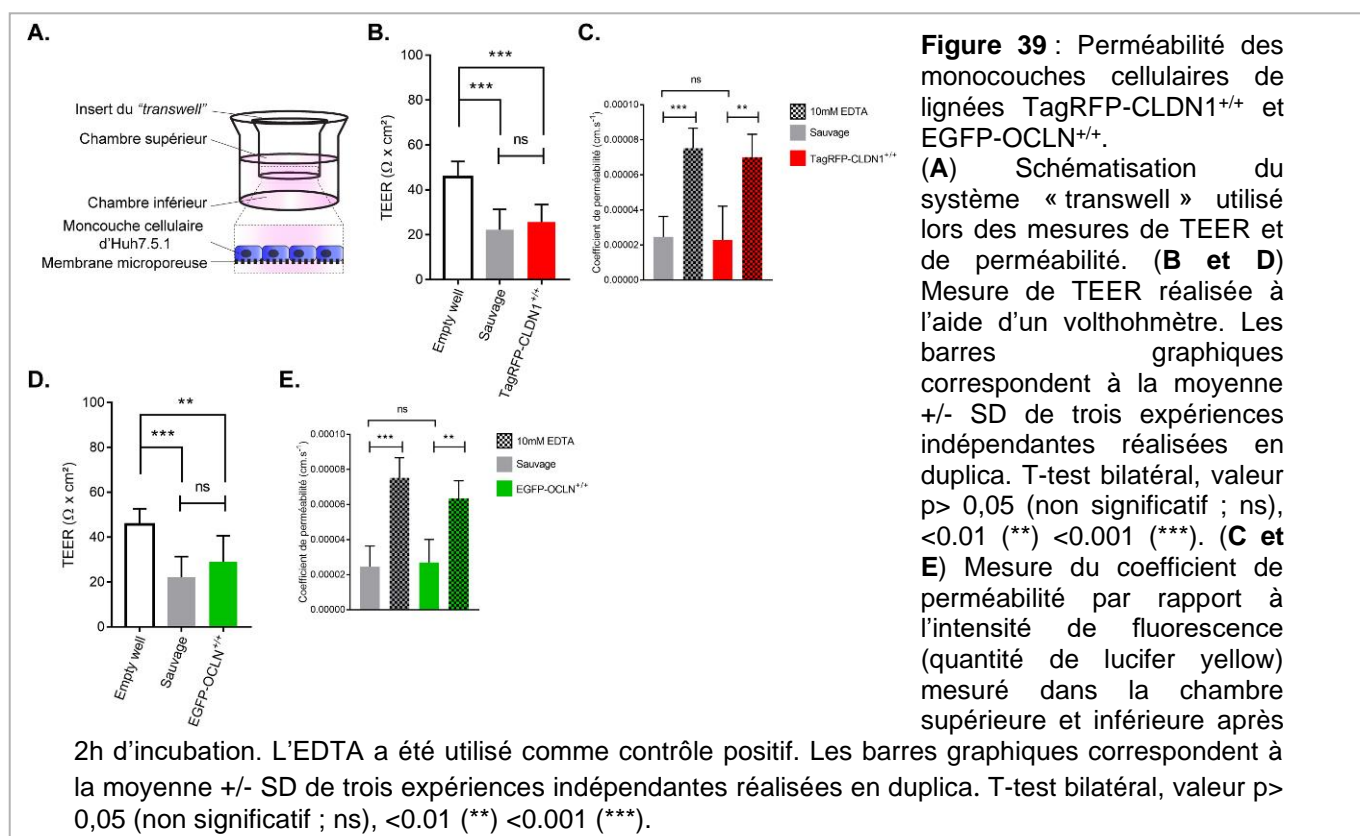


Figure 38 : Distribution cellulaire de la Tag-RFP et de l'EGFP-OCLN dans les lignées cellulaires éditées.

Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles pendant 48 heures puis fixées et marquées (B, D-H) ou observées en temps réel (C). Les lamelles ont été observées par microscopie confocale. Les images représentent des vues 3D XY (B-D, et G) ou ZY (E-F et H) de multiples plans Z. (A) Représentation schématique de la position des Tjs à la jonction cellule-cellule et des protéines ZO1, OCLN, CLDN1, Ezrin au sein d'un épithélium polarisé. (B) Les lignées Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} (cyan) et sauvages ont été marquées avec des anticorps anti-OCLN (magenta) et anti-Ezrin (orange) et du Dapi (bleu). Echelle = 5 µm (C) La lignée Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} a été incubée avec une solution de marquage Draq5 pour visualiser le noyau (bleu) avant imagerie 3D par microscopie confocal. Echelle = 5 µm. (C) Les lignées Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} (cyan) et sauvages ont été fixées et marquées avec des anticorps anti-ZO1 (magenta) et anti-Ezrin (rouge) et du Dapi (bleu). Echelle = 5 µm. (E-F) Merge des immunofluorescences présentées en panel A et C respectivement. Les panels inférieurs représentent la coupe orthogonale YZ extraite du merge associé (pointillé blanc). Les pointillés blancs sur les panels inférieurs correspondant matérialisent le pôle apical des cellules (marquage Ezrin). Echelle = 5 µm (G) La lignée Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} a été transfectée avec une construction mCherry-CaaX pour visualiser la membrane plasmique (rouge) et marquée avec des anticorps anti-Ezrin (magenta) et du Dapi (bleu). Echelle = 5 µm. (F) Merge de l'immunofluorescence présenté en G. Les panels inférieurs représentent la coupe orthogonale YZ extraite du merge associé (pointillé blanc). Les pointillés blancs sur les panels inférieurs correspondent au marquage CAAX-mcherry et matérialisent la membrane plasmique des cellules. Echelle = 5 µm.

c) Caractérisation de l'influence de l'étiquette sur la fonction des protéines

Au sein des TJs, OCLN et CLDN1 jouent un rôle dans la perméabilité des épithéliums. Pour tester si les lignées cellulaires modifiées TagRFP-CLDN1^{+/+} et EGFP-OCLN^{+/+} présentent des caractéristiques fonctionnelles similaires à celle de la lignée sauvage, les cellules ont été cultivées pendant 4 jours sur la membrane d'un insert de « *transwell* » contenant des pores de 0.4 μm (Figure 39A). La perméabilité relative des monocouches a été déterminée par la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) à l'aide d'un voltohmmètre. La résistance mesurée ne montre aucune différence significative entre les cellules sauvages et les cellules TagRFP-CLDN1^{+/+} (Figure 39B), ainsi qu'entre les cellules sauvages et les cellules EGFP-OCLN^{+/+} (Figure 39D). Le TEER ne pouvant pas prendre en compte des différences subtiles, ces cellules ont aussi été soumises à un marqueur de phase fluide : le Lucifer yellow.



L'utilisation du Lucifer yellow permet de mesurer la quantité de fluorescence qui passe de la chambre supérieure à la chambre inférieure du système « *transwell* » avec un fluoromètre et ainsi calculer le coefficient de perméabilité. Un coefficient de perméabilité élevé dénote une forte perméabilité de la monocouche et au contraire

un coefficient faible montre une imperméabilité importante de la monocouche cellulaire. Comme précédemment observé avec le TEER, les cellules sauvages et les cellules TagRFP-CLDN1^{+/+} (Figure 39C) ou EGFP-OCLN^{+/+} (Figure 39E) ne présentent pas de différence significative en terme de perméabilité, tandis que l'incubation avec l'EDTA sert de contrôle, la destruction des TJs augmente le coefficient de perméabilité calculé indiquant une diminution de l'imperméabilité épithéliale dans les deux lignées cellulaires (Figure 39D-E).

C'est ensuite la capacité de diffusion des protéines TagRFP-CLDN1 et EGFP-OCLN aux TJs qui a été mesurée par imagerie en temps réel et la récupération de fluorescence après photoblanchiment (*Fluorescence recovery after photobleaching* : FRAP). Le FRAP a été réalisé en utilisant une région de 3.36 μm le long des TJs dans les deux lignées cellulaires éditées. La récupération de fluorescence (fraction mobile) a été quasi totale pour la TagRFP-CLDN1 et $\approx 70\%$ pour l'EGFP-OCLN (Figure 40 A-B-C), avec un $T_{1/2}$ d'environ 49 s pour les deux protéines (Figure 40D).

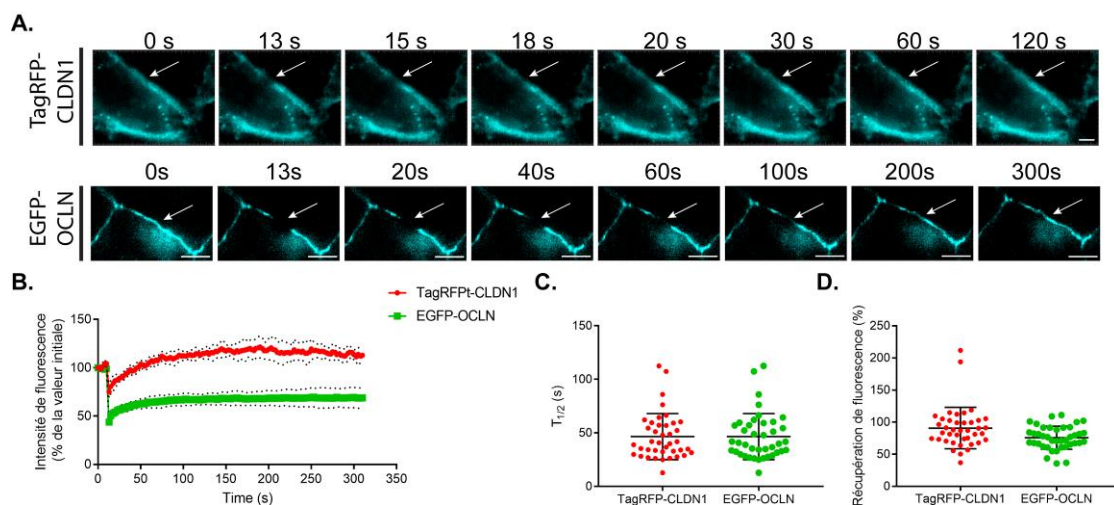


Figure 40 : Diffusion relative de la TagRFP-CLDN1 et de l'EGFP-OCLN des lignées cellulaires éditées.

Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} et EGFP-OCLN^{+/+} ont été ensemencées sur des lamelles et imagées en temps réel. Durant l'imagerie un photoblanchiment a été réalisé sur une zone d'un diamètre de 3.36 μm au niveau des TJs et la récupération de fluorescence a été monitorée. (A-B) Photo représentative de la récupération de fluorescence au cours du temps pour la TagRFP-CLDN1 et l'EGFP-OCLN (cyan) avant une image avant photoblanchiment (0s), après celui-ci (13s) et au temps indiqué après l'acquisition. Echelle = 5 μm (B) Graphique de l'intensité de fluorescence moyenne \pm SD en fonction du temps, normalisée par la fluorescence initiale de cinq expériences FRAP. (C-D) Graphique des pourcentages de récupération de fluorescence (C) et de récupération de $T_{1/2}$ (D) \pm SD mesurés et calculés à partir de 40 expériences FRAP acquises pendant 310 secondes chacune. Expérience réalisée dans le laboratoire de Yves Melhi.

Ces valeurs indiquent que la TagRFP-CLDN1 et l'EGFP-OCLN sont mobiles aux TJs avec un taux d'échange relativement rapide ce qui diffère avec les valeurs précédemment reportées (Shen, Weber, and Turner 2008).

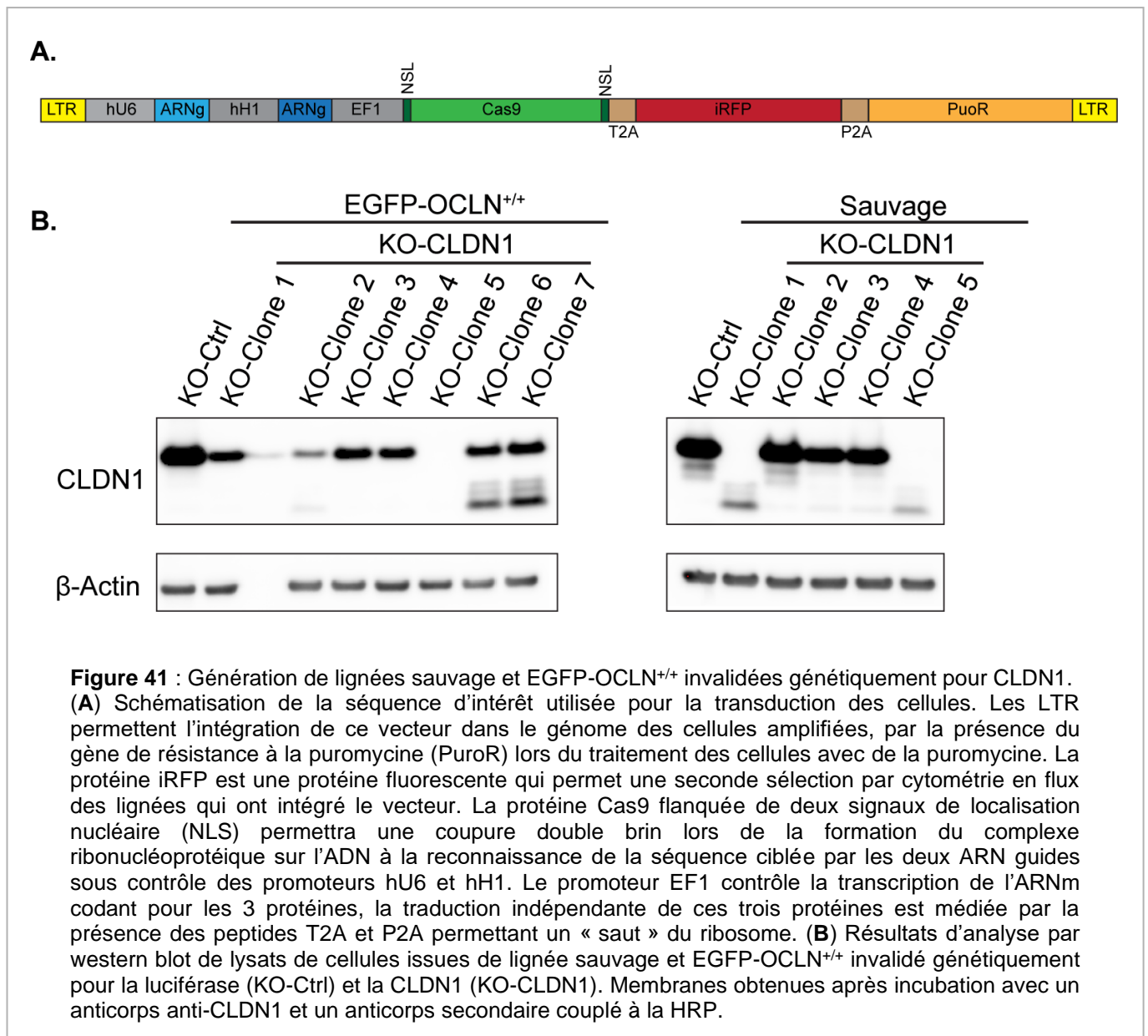
2. Génération de lignées invalidées génétiquement pour la CLDN1

Les lignées sauvages et EGFP-OCLN^{+/+} ont été invalidées génétiquement pour CLDN1 et caractérisées d'un point de vue fonctionnelle. L'invalidation génique a été réalisée à l'aide du système CRISPR/Cas9. Pour cela, les cellules ont été transduites par le biais de lentivirus codant pour deux ARN guide dirigés contre le gène codant pour *cldn1* (KO-CLDN1) ou la *luciférase* (KO-Ctrl), la protéine Cas9 avec deux signaux de localisation nucléaire (NLS), l'iRFP670 et le gène de résistance à la puromycine (PuroR) pour la sélection des lignées. Les promoteurs humains U6 et H1 (hU6 et hH1) permettent le recrutement de l'ARN Polymérase 3 et la transcription des ARN guides qui leur sont associés.

Lors de la traduction des protéines, deux séquences T2A et P2A d'origine virale vont permettre un « saut » du ribosome (ribosome skipping) (Figure 41A). Le « saut » du ribosome est un mécanisme de traduction alternatif dans lequel le peptide viral empêche le ribosome de lier de manière covalente le nouvel aa inséré sans pour autant arrêter la traduction résultant en un clivage apparent de co-traduction de la polyprotéine. L'ajout de puromycine dans le milieu a permis de forcer l'intégration de la séquence d'intérêt et de sélectionner les cellules exprimant le gène de résistance. Une semaine après leur traitement les cellules sélectionnées exprimant l'iRFP ont été triées par cytométrie en flux puis des dilutions en série ont permis d'isoler plusieurs clones.

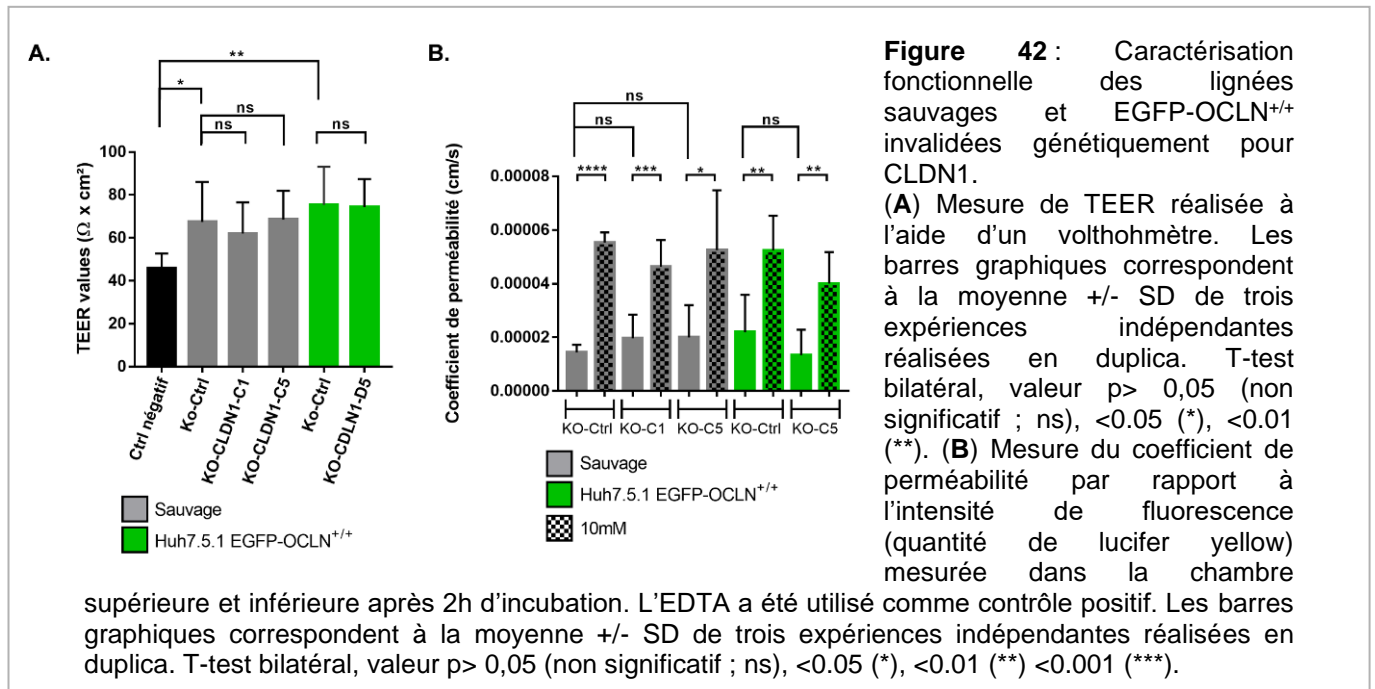
Ces lignées potentiellement invalidées génétiquement pour la CLDN1 ont été testées par WB. Dans les deux cas, différents profils ont pu être observés. Les lignées EGFP-OCLN^{+/+} KO-CLDN1 ont présenté des profils correspondant à une invalidation partielle (Clone 1, 2, 3 et 4), à l'apparition de formes tronquées de CLDN1 (Clone 6 et 7) et à une invalidation totale dans le cas du clone numéro 5 (Figure 41B). Les lignées sauvages ont présenté elles aussi différents profils dont

une invalidation presque totale pour le clone 5 avec la faible expression d'une forme tronquée de CLDN1 (Figure 41B).



Pour ces lignées, l'influence de l'invalidation de CLDN1 sur la fonctionnalité des TJs a aussi été déterminée. La perméabilité relative des monocouches des KO-Ctrl et KO-CLDN1 des lignées sauvages et EGFP-OCLN^{+/+} a été mesurée à l'aide d'un voltohmmètre.

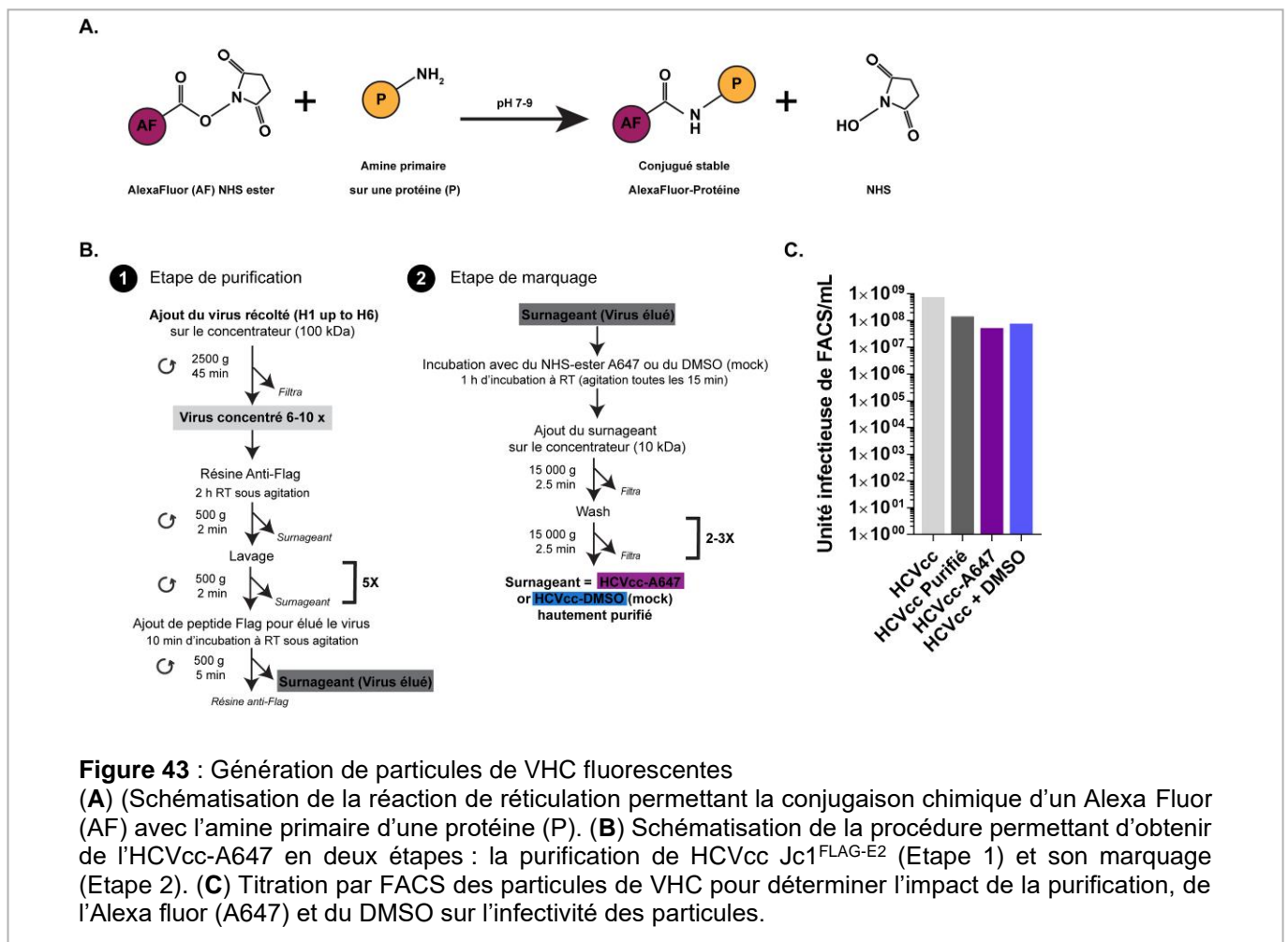
La résistance mesurée ne montre aucune différence significative entre les lignées KO-Ctrl et les lignées KO-CLDN1 (Figure 42A). A nouveau, afin de mesurer des différences subtiles, les lignées ont aussi été soumises à un marqueur de phase fluide le Lucifer yellow. Comme précédemment observé avec le TEER, les lignées KO-Ctrl et KO-CLDN1 ne présentent pas de différence significative en terme de perméabilité, tandis que l'incubation avec l'EDTA augmente la perméabilité de la monocouches cellulaires (Figure 42B)



3. Génération de particules de VHC fluorescentes

Afin de pouvoir suivre en temps réel des particules virales de VHCcc, celles-ci doivent être marquées. Une méthode fréquemment utilisée est l'ajout de traceurs lipophiles fluorescents (DiD) impactant fortement l'infektivité du VHC (Coller et al. 2009 ; Baktash et al. 2018 ; 2019). Il a alors été nécessaire d'envisager une autre stratégie et c'est le principe de réticulation chimique activée par un ester (N-Hydroxysuccinimid-ester : NHS-ester) qui a été utilisé. L'ester NHS activé va réagir avec une amine primaire et ainsi lier le réactif d'étiquetage Alexa Fluor à l'extrémité N-terminale de la protéine (Figure 43A). Ce marquage est aspécifique, le NHS-ester réagira avec toutes les amines primaires présentes dans la solution. Cette technique nécessite une étape préalable de purification pour ne pas étiqueter les protéines libres et ainsi que celles des vésicules extracellulaires présentes dans le milieu.

Dans cette optique, c'est la souche HCVcc Jc1^{FLAG-E2} qui a été sélectionnée car les particules de VHC ainsi produites sont répliquatives et présentent une glycoprotéine d'enveloppe E2 en fusion avec une étiquette FLAG. L'étiquette FLAG permet de purifier ces virus sur une résine couplée à un anticorps anti-FLAG et ainsi lier les virus à la résine pour ensuite éliminer toute trace de vésicules extracellulaires ou de protéines libres présentes dans le milieu par rinçages successifs de la résine. L'élué est réalisé par compétition lors de l'ajout d'un peptide FLAG (Figure 43B).



L'optimisation de cette stratégie de purification et de marquage a permis d'obtenir du VHC fluorescent : HCVcc-A647. L'infektivité de ce virus a été déterminée par cytométrie en flux et comparée à celle du virus élué traité au DMSO (contrôle), ainsi qu'au virus concentré et purifié. La différence d'unité infectieuse mesurée entre les virus concentrés et les virus purifiés a été d'un log indiquant un léger impact de la procédure de purification sur l'infektivité des particules virales.

Cependant, les particules de VHC purifiées non marquées (HCVcc + DMSO) et marquées avec l'Alexa fluor 647 (HCVcc-A647) ont présenté un pouvoir infectieux très similaire (Figure 43C), indiquant que la présence d'Alexa-Fluor 647 ne perturbe pas l'infection par le VHC.

RESULTATS DEUXIEME PARTIE

Etude de la dynamique spatiotemporelle des interactions VHC-récepteurs

I. Permissivité des lignées cellulaires éditées aux VHC

L'utilisation des différentes lignées en imagerie cellulaire pour l'étude des interactions CLDN1-VHC ou encore OCLN-VHC repose sur leur permissivité au VHC. Pour cela les différentes lignées générées ont été infectées avec du VHC répliquatif (HCVcc Jc1-Luc) ou des pseudo-particules de VHC (HCVpp J6) ou des pseudo-particules porteuse de l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSVpp) en tant que contrôle positif d'infection. L'ensemble de ces particules virales possède la luciférase en tant que gène rapporteur de l'infection. Elle permet de déterminer la permissivité des lignées par le biais de la quantification de l'activité luciférase (Relative luciférase unit = RLU) après infection des cellules avec les différentes souches virale HCVcc (Jc1-Luc), HCVpp (J6) et VSVpp (Figure 44).

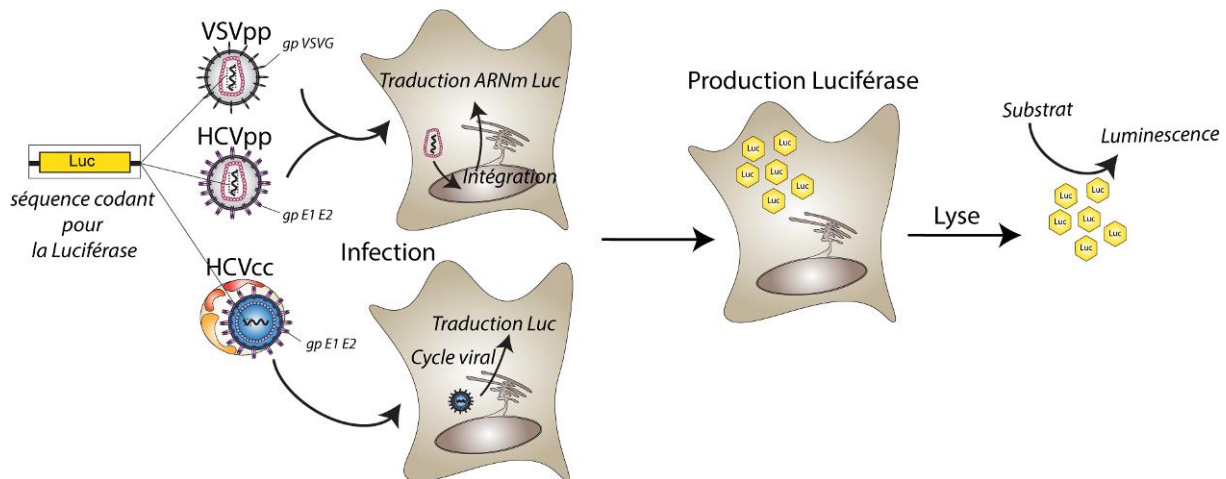


Figure 44 : Schéma du mécanisme d'action des souches virales rapportrices utilisées
Les pseudo-particules (HCVpp et VSVpp) contiennent la séquence codant la luciférase firefly flanquée par les LTR du HIV permettant son intégration dans le génome de la cellule lors de l'infection, elle sera transcrite puis traduite, entraînant la production de luciférase. La souche d'HCVcc contient dans son génome la séquence codant pour la luciférase firefly entraînant sa production au cours du cycle viral. Les cellules sont lysées 72 heures après infection. L'ajout du substrat de la luciférase permet alors la détection de son activité par luminescence et de ce fait l'infection.

L'insertion de l'étiquette TagRFP en N-terminal de la CLDN1, malgré son absence d'impact sur la fonction physiologique de la protéine (Cf. Chapitre 1), a eu un effet drastique sur sa permissivité vis-à-vis du VHC. La lignée Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} n'est plus permissive au VHC (Figure 45A). A l'opposé, l'insertion de l'EGFP en N-terminal de l'OCLN n'a pas impacté la permissivité. Une légère diminution a été observée pour les cellules éditées par rapport à leur homologue de type sauvage avec HCVcc et VSVpp. Cependant, étant donné qu'il n'est pas connu que VSV entre de manière OCLN dépendante, l'activité luciférase obtenue à partir de HCVcc a été normalisée par le signal obtenu à partir de VSVpp et montre que la lignée Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} est tout aussi permissive que la lignée Huh7.5.1 sauvage (Figure 45B).

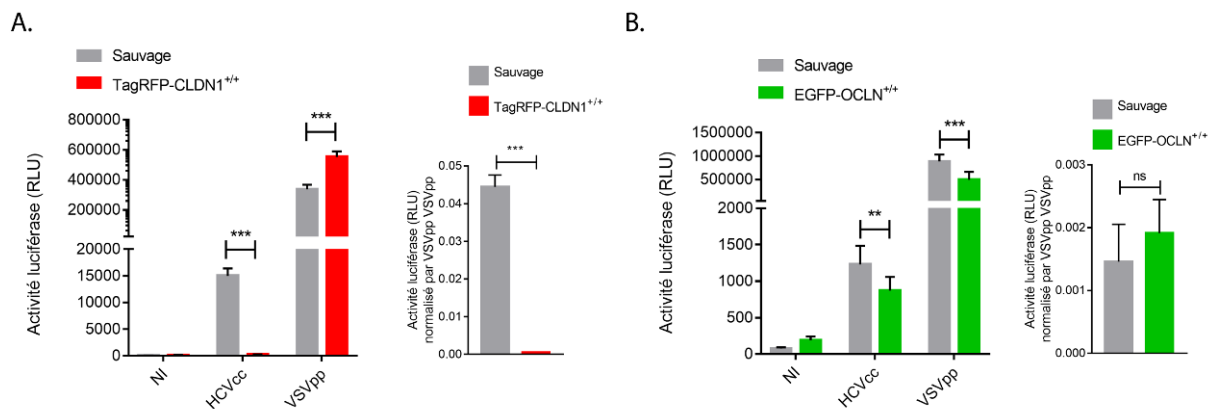


Figure 45 : Permissivité au VHC des lignées TagRFP-CLDN1^{+/+} et EGFP-OCLN^{+/+} générées. HCVcc et VSVpp ont été inoculés afin de comparer la permissivité des lignées sauvages et TagRFP-CLDN1^{+/+} (A) ; des lignées sauvages et EGFP-OCLN^{+/+} (B). (A-B) Le premier graphique correspond à la luminescence mesurée après inoculation des différentes souches virales indiquées, le second graphique correspond à la normalisation de l'activité luciférase obtenue à partir de HCVcc par le signal obtenu à partir de VSVpp. La luminescence est mesurée 72 heures post-infection. RLU : *Relative luciferase unit*. Les barres graphiques correspondent à la moyenne +/- SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata. T-test bilatéral, valeur $p > 0,05$ (non significatif ; ns), $< 0,01$ (**) $< 0,001$ (***).

L'absence d'impact de l'insertion de l'EGFP en N-terminal de l'OCLN sur les autres récepteurs du VHC : CLDN1, CD81 et SR-B1 a été vérifié par rétro-transcription et PCR quantitative en temps réel. Aucune différence significative dans l'expression des ARNm de CLDN1, CD81 ou SR-B1 n'a pu être détectée entre les lignées sauvages et EGFP-OCLN^{+/+} (Figure 46A). La formation du complexe CD81-CLDN1 est l'une des nombreuses interactions VHC-récepteurs nécessaires à son entrée. Etant donné que la lignée TagRFP-CLDN1^{+/+} n'est plus permissive au VHC, l'impact de l'expression de la TagRFP-CLDN1 sur CD81 a été mesuré par le biais d'une qPCR ainsi qu'un WB. Aucune différence significative n'a été observée pour l'expression de CD81 au niveau de l'expression de son ARNm (Figure 46B) et de son expression protéique (Figure 46C).

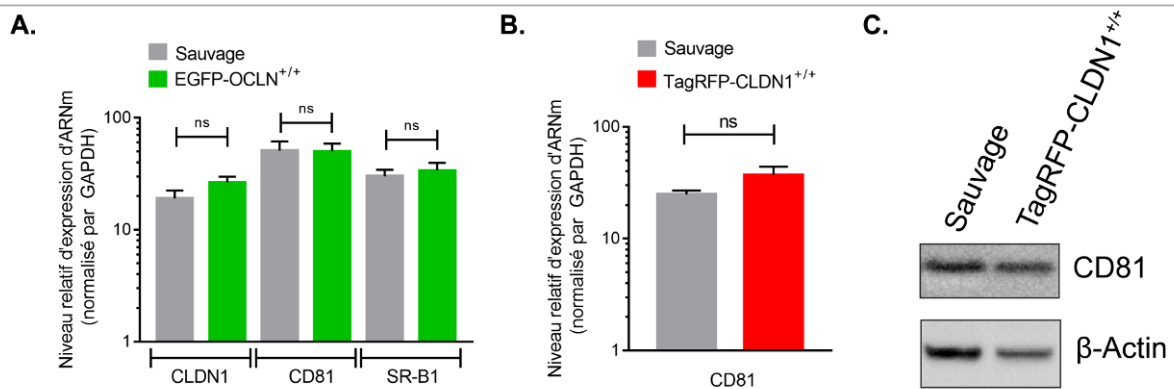


Figure 46 : Expression relative des récepteurs du VHC dans les lignées éditées TagRFP-CLDN1^{+/+} et EGFP-OCLN^{+/+}

(A-B) Les barres graphiques correspondent à la moyenne +/- SD de trois expériences indépendantes réalisées en tripliqua. T-test bilatéral, valeur $p > 0,05$ (non significatif ; ns). (A) La quantité relative d'expression d'ARNm de CLDN1, CD81 et SR-B1 a été mesurée par RT-qPCR sur une extraction d'ARN à partir de cellules sauvages (gris) ou EGFP-OCLN^{+/+} (vert) et normalisée par l'expression de l'ARNm de GAPDH. (B) La quantité relative d'expression d'ARNm de CD81 a été mesurée par RT-qPCR sur une extraction d'ARN à partir de cellules sauvages (gris) ou TagRFP-CLDN1^{+/+} (rouge) et normalisée par l'expression de l'ARNm de GAPDH. (C) Résultats d'analyse par western blot de lysats de cellules issues de la lignée sauvage et éditée TagRFP-CLDN1^{+/+}. Membrane obtenue après incubation avec un anticorps anti-CD81 et un anticorps secondaire couplé à la HRP. Le marquage anti- β -actine a été utilisé comme témoin de charge.

Les lignées KO-Ctrl ont été conçues pour cibler la séquence de la luciférase firefly. Dans un premier temps, la permissivité de la lignée Huh7.5.1 sauvage ou EGFP-OCLN^{+/+} a dû être comparée à celle des lignées invalidées pour la luciférase (KO-Ctrl) afin de vérifier l'impact de l'expression de Cas9 et des ARN guides sur l'expression de la luciférase firefly lors d'une infection virale pour valider la lignée comme contrôle d'expérience. Aucune différence significative n'a été observée entre les lignées d'origine et KO-Ctrl vis-à-vis de la détection de luciférase après infection avec HCVpp (Figure 47 A-B). La permissivité des KO-CLDN1 a pu être ainsi comparée à celle des lignées KO-Ctrl. Comme attendu l'invalidation génique de la CLDN1 les rend non permissives au VHC (Figure 47 C).

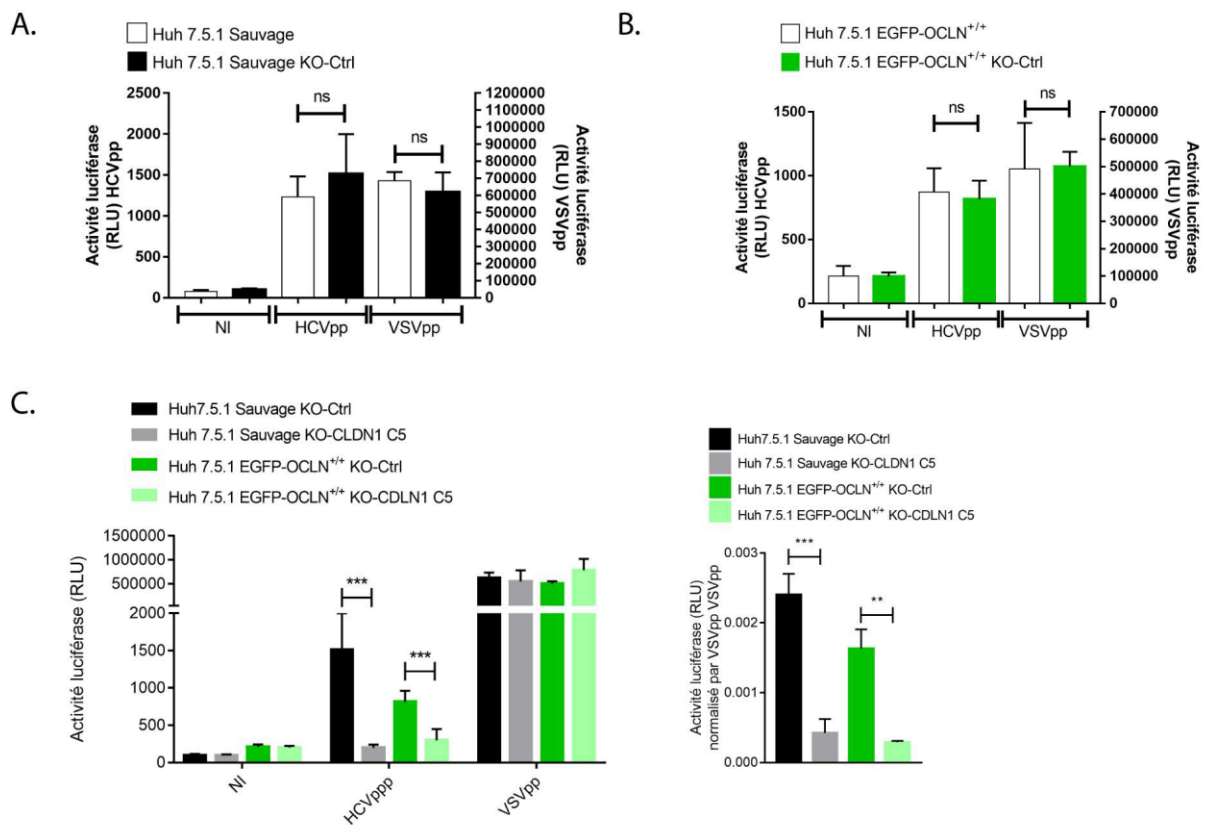


Figure 47 : Permissivité des lignées KO générées aux VHC

HCVpp et VSVpp ont été inoculés afin de comparer leur permissivité aux VHC. La luminescence est mesurée 72 heures post-infection. RLU : unité relative du luminomètre. (A) Comparaison de la permissivité des lignées sauvages et sauvages KO-Ctrl. (B) Comparaison de la permissivité des lignées EGFP-OCLN^{+/+} et EGFP-OCLN^{+/+} KO-Ctrl. (C) Comparaison de la permissivité des lignées sauvages KO-Ctrl, sauvages KO-CLDN1, EGFP-OCLN^{+/+} KO-Ctrl et EGFP-OCLN^{+/+} KO-CLDN1. Le premier graphique correspond à la luminescence mesurée après inoculation des différentes souches virales indiquées, le second graphique correspond à la normalisation de l'activité luciférase obtenue à partir de HCVpp par le signal obtenu à partir de VSVpp. Les barres graphiques correspondent à la moyenne +/- SD de trois expériences indépendantes réalisées en tripliqua. T-test bilatéral, valeur $p > 0,05$ (non significatif ; ns), < 0.01 (**), < 0.001 (***)

La lignée TagRFP-CLDN1 ne peut être utilisée pour des études en temps réel des interactions VHC-CLDN1 tant que l'impact exact de l'étiquette sur le cycle d'infection du VHC n'est pas déterminé. Cependant la lignée EGFP-OCLN^{+/+} est toujours permissive au VHC ce qui permet l'étude de l'interaction OCLN-VHC par imagerie en temps réel. De plus l'inactivation génique CLDN1 dans cette lignée permettra l'étude de l'influence de CLDN1 sur la dynamique d'interaction VHC-OCLN.

II. Dynamique spatiotemporelle d'interaction VHC-OCLN

1. L'association VHC-OCLN se produit hors des jonctions serrées

Tous les outils biologiques nécessaires à l'étude de l'interaction VHC-OCLN ont été générés (Cf. Chapitre I.A et C, ainsi que Chapitre II.A). Les virus infectieux HCVcc-A647 ont été inoculés aux cellules éditées EGFP-OCLN^{+/+} et des études en microscopie confocale ont été réalisées sur des échantillons fixés et vivants. Dans ce contexte l'inoculation de microsphère fluorescente à la place de HCVcc-A647 sert de contrôle de spécificité d'interaction. En effet les microsphères inertes n'entraînent pas le recrutement d'OCLN.

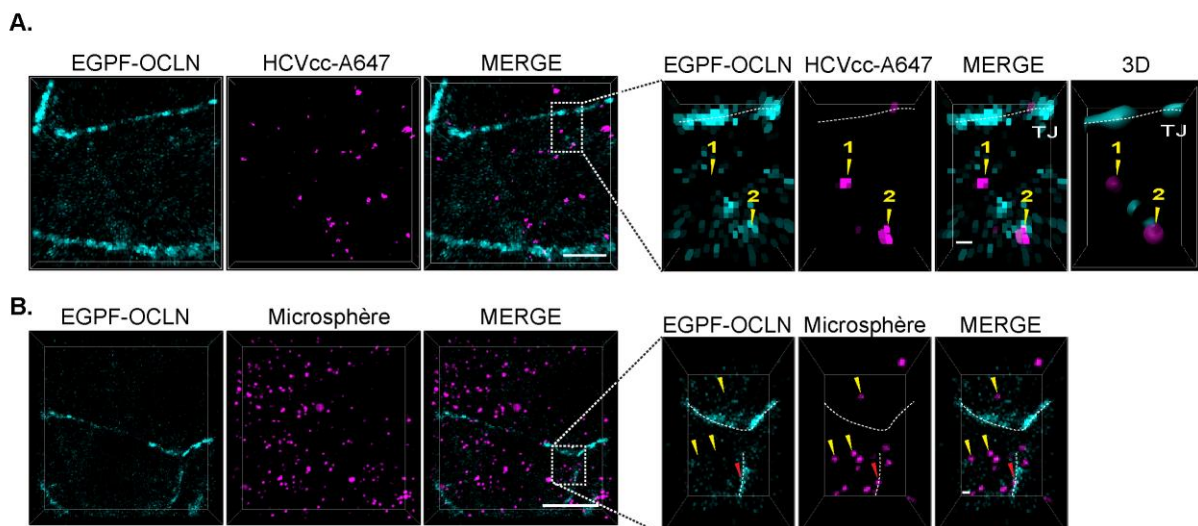


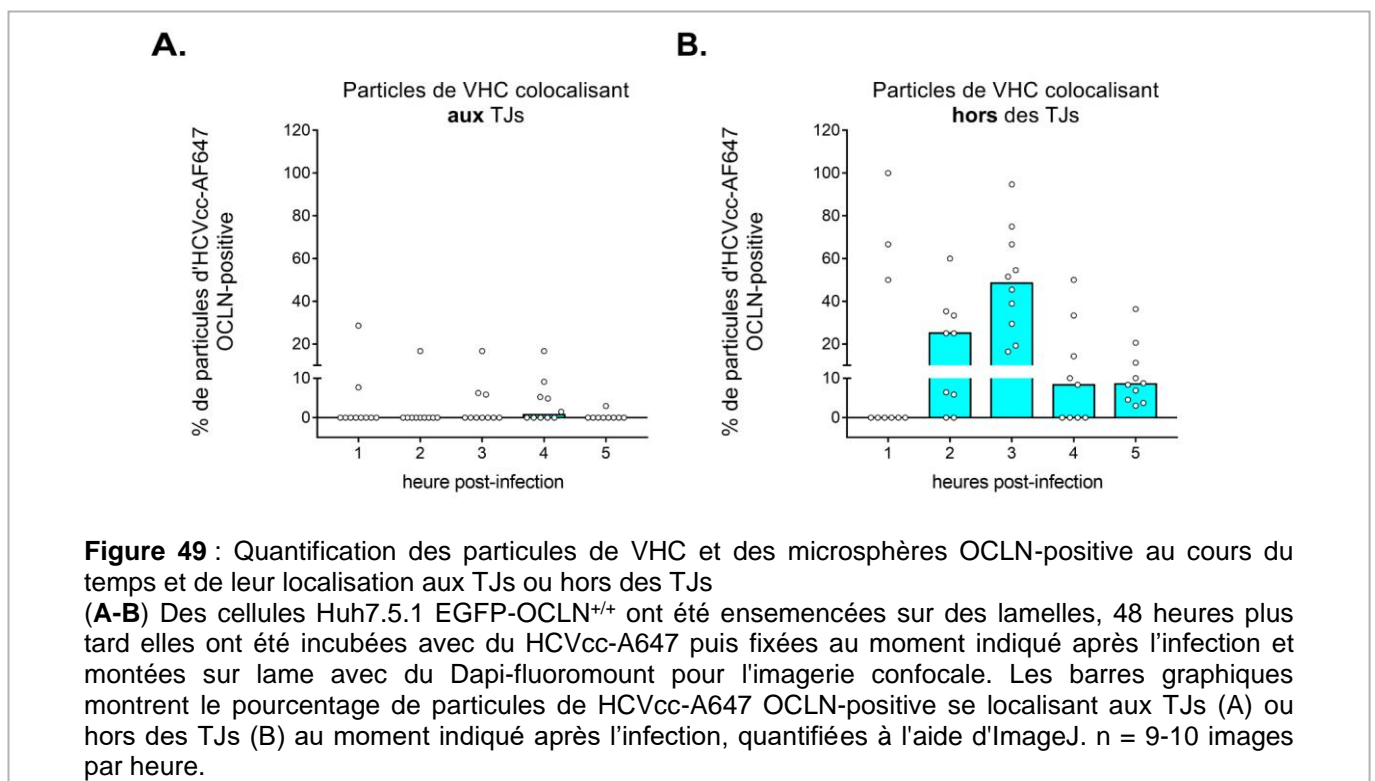
Figure 48 : Localisation de l'interaction HCV-OCLN et microsphère-OCLN

Les cellules Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} ont étéensemencées sur des lamelles, 48 heures plus tard elles ont été incubées avec du HCVcc-A647 ou des microsphères puis fixées au moment indiqué après l'inoculation et montées sur lame avec du Dapi-fluoromount pour l'imagerie confocale. **(A)** Images confocales 3D représentatives (vue du dessus) de EGFP-OCLN^{+/+} (cyan) et HCVcc-A647 (magenta) acquises 5 heures post incubation. Barre d'échelle = 5 μ m. Le second panel correspond aux grossissements de la zone en pointillé blanc. Barre d'échelle = 0.5 μ m Les flèches jaunes mettent en évidence deux particules de HCVcc à la surface de la cellule, la flèche 1 correspond à une particule sans signal d'OCLN et la flèche 2 correspond à une particule virale qui colocalise avec le signal OCLN. La ligne pointillée blanche indique la position d'une TJ. **(B)** Images confocales 3D représentatives (vue du dessus) de EGFP-OCLN^{+/+} (cyan) et des microsphères (magenta) acquises 6 heures post incubation. Barre d'échelle = 10 μ m. Le second panel correspond aux grossissements de la zone en pointillé blanc. Barre d'échelle = 0.5 μ m Les flèches jaunes mettent en évidence des microsphères localisées hors des TJs et la flèche rouge une microsphère à la TJs qui colocalise avec le signal de l'OCLN. Les lignes pointillées blanches indiquent la position des TJs.

Pour déterminer la localisation des particules de VHC lors de l'interaction virus-hôte, deux expériences de cinétique ont été menées de front sur des cellules éditées EGFP-OCLN^{+/+} par microscopie confocale sur échantillons fixés. L'une avec de l'HCVcc-A647 (Figure 48A) et l'autre des microsphères fluorescentes de 0,04 µm, pour être au plus proche de la taille d'un virus (Figure 48B). De manière générale, les particules virales et les microsphères ont été observées loin des TJs. Les colocalisations avec l'OCLN ont été observées majoritairement en dehors des jonctions serrées pour l'HCVcc-A647 (Figure 48A, flèche jaune n°2) alors que dans le cas des microsphères celles-ci ont été observées principalement au niveau des TJs (Figure 48B, flèche rouge).

Pour obtenir des informations quantitatives, le signal de l'HCVcc-A647 ou des microsphères a été segmenté, les agrégats ont été exclus, les particules ont ainsi été dénombrées et la présence ou l'absence de colocalisation avec l'OCLN a été évaluée. De plus, la proportion de particules hors des TJs ou aux TJs a pu être déterminée (Figure 32 dans Mat et Meth).

La grande majorité des événements d'associations VHC-OCLN se sont produits en dehors des TJs (Figure 49).



De plus, un pic de colocalisation autour de 3 h post-infection, qui diminue par la suite, a été observé ce qui corrèle avec une expérience menée par nos collaborateurs (Pablo Gastaminza, CNB, Espagne) démontrant que les particules infectieuses du VHC nécessitent environ 3 à 4 h pour être internalisées (Figure 50). A l'opposé, la proportion de microsphères OCLN-positive est très faible (de l'ordre de 4%) et dans ce cas correspond majoritairement à une localisation au niveau des TJs (Figure 51).

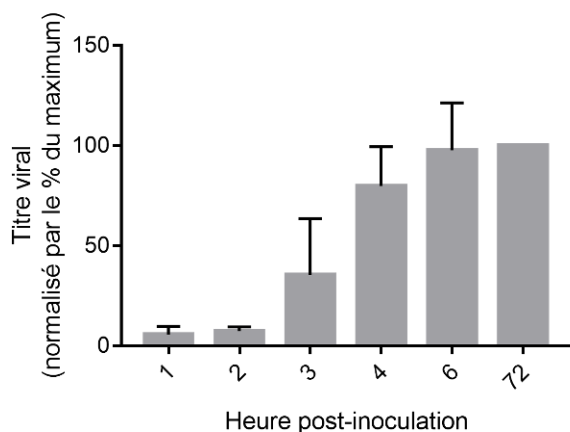


Figure 50 : Cinétique d'infection du VHC
Des cellules Huh7.5.1 ont été inoculées avec une dilution en série de HCVcc, les inocula ont été retirés aux heures indiquées et 72 heures après l'infection, les cellules infectées ont été quantifiées par immunofluorescence. Les barres graphiques correspondent à la moyenne +/- SD de trois expériences effectuées en triplicata. Expérience réalisée par nos collaborateurs (Pablo Gastaminza, CNB, Espagne)

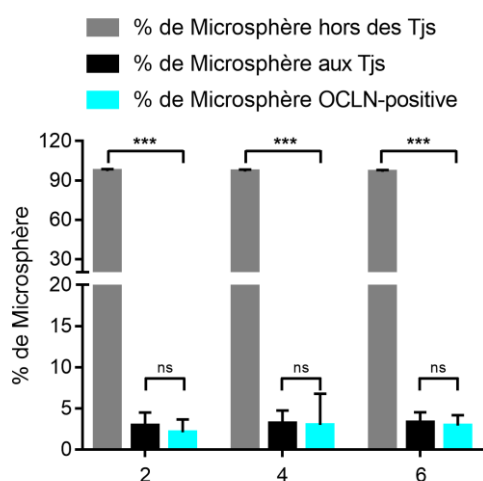


Figure 51 : Quantification des microsphères OCLN-positive au cours du temps et de leur localisation aux TJs ou hors des TJs

Des cellules Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} ont étéensemencées sur des lamelles, 48 heures plus tard elles ont été incubées avec des microsphères puis fixées au moment indiqué après l'inoculation et montées sur lame avec du Dapi-fluoromount pour l'imagerie confocale. Les barres graphiques montrent le pourcentage de microsphères en fonction de leur localisation hors des TJs (gris), aux TJs (noir) ainsi que le pourcentage de microsphères OCLN-positives au moment indiqué après l'inoculation, quantifiées à l'aide d'ImageJ. n = 9-10 images par heure.

Pour mieux comprendre la dynamique spatio-temporelle du virus, l'imagerie en temps réel sur cellules vivantes EGFP-OCLN^{+/+} incubées pendant 3 h avec HCVcc-A647 a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal par fluorescence à

disque rotatif (*Spinning disk confocal microscope*). Le suivi de particules virales uniques HCVcc-A647 a montré que celles-ci ne sont ni recrutées ni dirigées vers les TJs (Figure 52A), indiquant que l'hypothèse dans laquelle la particule virale du VHC glisse vers les TJs pour recruter l'OCLN ne correspond pas à ce qui est observé dans notre modèle d'étude. De plus, l'internalisation apparente de particule du VHC OCLN-positive hors de TJs a pu être suivie (Figure 52B). Malheureusement, ces événements ont été trop rares et trop difficiles à détecter de manière fiable pour être quantifiés.

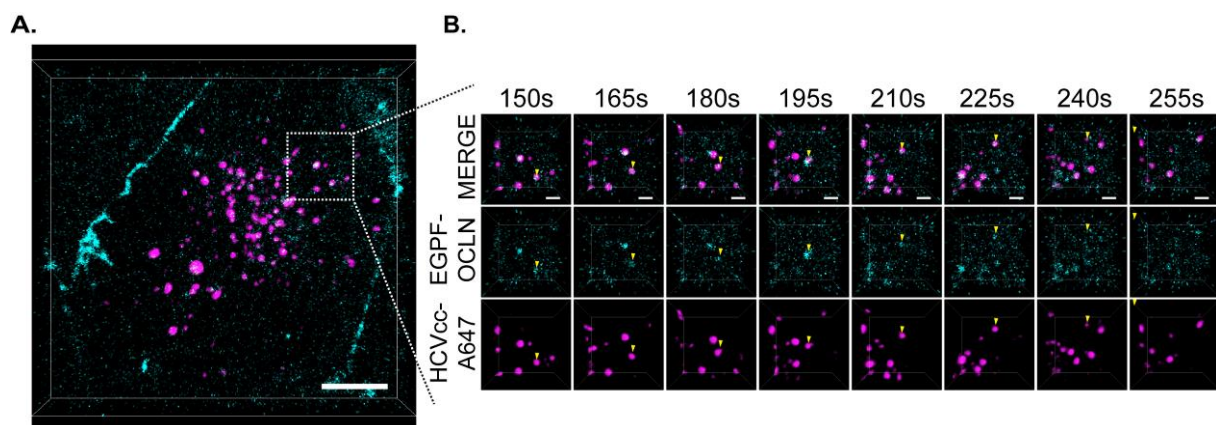


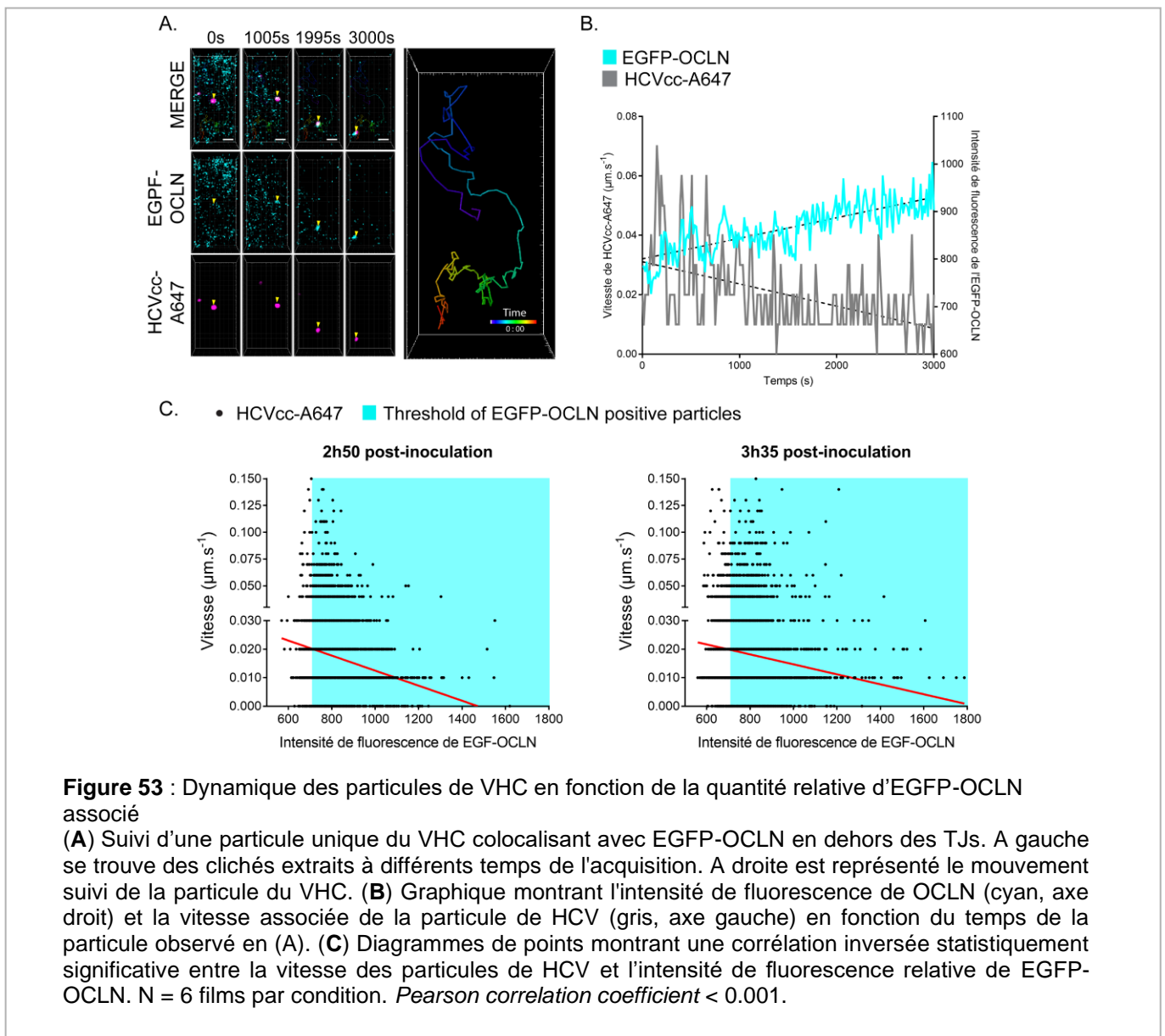
Figure 52 : Imagerie en temps réel de l'association VHC-OCLN

Les cellules Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} ont été incubées avec du HCVcc-A647 pendant 1 à 5 heures avant l'imagerie à l'aide d'un microscope confocal à disque rotatif. Des images en trois dimensions ont été acquises toutes les 15 sec pendant 30 à 45 min. (A) Vue 3D du dessus dans laquelle les signaux EGFP-OCLN (cyan) et HCVcc-A647 (magenta) ont été fusionnés. Barre d'échelle = 10 μm. (B) Série de clichés agrandis extraite d'un film en temps réel, la zone agrandie correspond au carré blanc en pointillé de (A). Les pointes de flèches jaunes mettent en évidence une particule du VHC qui colocalise avec de l'EGFP-OCLN et qui disparaît de manière concomitante au cours du temps. Barre d'échelle = 5 μm.

2. L'association VHC-OCLN diminue la mobilité du complexe

Ensuite, les propriétés dynamiques de particules virales uniques en fonction de leur quantité relative d'OCLN associée ont été étudiées. Le suivi spatiotemporel de ces particules uniques a mis en évidence que le gain d'OCLN sous les particules de VHC était associé à une mobilité réduite du complexe (Figure 53A-B). Une quantification automatisée de la vitesse des particules du VHC et de son intensité d'OCLN a été réalisée et une corrélation inversée significative a été observée entre la vitesse des particules du VHC et l'intensité de fluorescence de l'OCLN (Figure 53

C). Ces résultats montrent que le recrutement de l'OCLN était nécessaire pour stabiliser le virion à la membrane plasmique.



DISCUSSION

I. Génération d'outils biologiques pour l'imagerie sur cellules vivantes

L'objectif de ma thèse a consisté à étudier et comprendre la dynamique d'interaction de particules virales uniques de VHC avec ces récepteurs. Nous avons choisi d'utiliser l'imagerie sur cellules vivantes, un outil puissant pour visualiser et étudier des interactions virus-récepteurs en temps réel. Dans ce contexte, l'imagerie réalisée doit être rapide, sensible, de haute résolution, confocale, et réalisée sur des modèles cellulaires et viraux adaptés. Les lignées cellulaires modifiées doivent être physiologiquement fonctionnelles et se rapprocher de la complexité architecturale de l'organe dont elles proviennent. La technique de marquage des particules virales quant à elle ne doit pas impacter le pouvoir infectieux et permettre la détection de particules virales uniques (Deffieu and Gaudin 2019).

La première étape de mes travaux a consisté à développer les outils biologiques adaptés à l'étude de la dynamique VHC-récepteurs. Les lignées cellulaires majoritairement utilisées pour l'étude de la dynamique d'interaction virus-récepteurs sont des lignées cellulaires transfectées avec un vecteur codant pour le récepteur d'intérêt en fusion à une étiquette fluorescente. Que cette expression soit transitoire ou stable, le promoteur associé conduit à une surexpression de ces protéines et cela peut être nocif pour la cellule. L'impact de la surexpression varie en fonction des protéines ciblées et peut entraîner l'activation ou la surcharge de voies biologiques spécifiques, la perturbation de la régulation de ces protéines ou encore leur agrégation (Bolognesi and Lehner 2018). Cela peut alors impacter directement la dynamique d'interactions étudiée et causer des artefacts tels qu'une localisation subcellulaire ectopique ou encore la formation d'un complexe protéique erroné et ainsi fausser les résultats en découlant (Gibson, Seiler, and Veitia 2013). Dans le cas de l'OCLN, la transfection transitoire d'ADN est responsable de sa mauvaise localisation (M. Furuse et al. 1993) et ne convenait donc pas à l'étude de l'entrée du VHC.

Afin d'éviter les impacts dus à la surexpression nous avons utilisé la bio-ingénierie à l'aide du système CRISPR/Cas9, comme décrit précédemment (Chou et

al. 2016 ; Ran et al. 2013) pour surveiller la distribution et l'expression des protéines endogènes. Nous avons généré ainsi deux lignées cellulaires exprimant la CLDN1 en fusion à la TagRFP et l'OCLN en fusion à l'EGFP. Notre stratégie a permis l'obtention de lignées clonales éditées pour la TagRFP-CLDN1 et l'EGFP-OCLN au niveau de leur génome et sur les deux allèles (Figure 35). Il convient toutefois de noter que l'efficacité de l'édition était faible ($\approx 0,5\%$), ce qui est courant lorsqu'on tente d'insérer de grands fragments d'ADN en utilisant la recombinaison homologue (HR). L'efficacité d'édition pourrait être augmentée notamment par le biais de méthodes d'édition CRISPR améliorées, basées sur l'assemblage d'extrémités non homologues (Non-homologous end joining) (Suzuki et al. 2016 n; Sawatsubashi et al. 2018). Cependant, les contraintes associées à la conception de la séquence cible adéquate confèrent une complexité à ces nouvelles stratégies d'édition.

L'insertion de l'étiquette au sein du génome et son expression a été vérifiée par WB. Une diminution de l'intensité de la bande TagRFP-CLDN1 ou EGFP-OCLN par rapport à la CLDN1 ou l'OCLN sauvage a été observée (Figure 36). Nous avons attribué cette différence à la diminution du rendement de transfert pour les protéines de haut poids moléculaire. En effet, les expériences de cytométrie en flux ont confirmé que l'expression de la CLDN1 et de l'OCLN n'était pas affectée par l'ajout de leur étiquette fluorescente respective (Figure 37).

En microscopie, nous avons observé une localisation de ces deux protéines majoritairement au niveau des TJs (Figure 38 B-D), comme attendu pour deux protéines membranaires associées aux TJs (Paris et al. 2008). Cependant, un sous-ensemble de protéines CLDN1 a également été observé en dehors des TJs, une distribution pas si surprenante en prenant en compte que les CLDN exercent également de nombreuses fonctions « non canoniques » (Hagen 2017; Van Itallie, Tietgens, and Anderson 2017). Nous avons pu aussi observer que la fixation des cellules éditées TagRFP-CLDN1 entraîne la diminution de la qualité du signal fluorescent (Figure 38B) comparée à son observation en cellules vivantes (Figure 38C). Cette observation pourrait s'expliquer en partie par l'augmentation du bruit de fond induit par le PFA elle-même ou par un effet indésirable de l'un des réactifs de fixation sur la photophysique de la protéine TagRFP-T.

Nous avons ensuite vérifié que l'insertion des étiquettes n'impacte pas la fonction des protéines au sein de TJs sur nos lignées doubles éditées. Les mesures de TEER (Figure 39B et D) et des coefficients de perméabilité (Figure 39C et E) ont démontré que l'édition en N-terminal de ces deux protéines ne perturbe pas la fonction perméabilité des TJs. De plus, les expériences de photoblanchiment (FRAP) ont montré que l'insertion de l'étiquette n'empêche pas la mobilité de CLDN1 et de l'OCLN (Figure 40). Elles sont très mobiles aux TJs avec des taux de récupération de fluorescence rapides qui diffèrent des données précédemment publiées, notamment pour la CLDN1 qui y est décrite comme immobile (Shen, Weber, and Turner 2008). Ces différences peuvent être expliquées par la différence de lignée cellulaire utilisée : carcinome hépatocellulaire humain (Huh7.5.1) contre cellules de rein canines (MDCK) ; l'étiquette utilisée pour la CLDN1 qui est la TagRFP-T et non l'EGFP ; ou encore la stratégie d'expression : édition du génome contre une surexpression transitoire. Par conséquent, des travaux supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si la mobilité de ces deux protéines dépend du type de cellule et si la stratégie de marquage a un impact sur celle-ci.

Ces lignées ont pour finir été testées pour leur permissivité vis-à-vis du VHC (Figure 45). La lignée EGFP-OCLN^{+/+} est permissive de manière comparable à la lignée sauvage. Cependant malgré une fonctionnalité physiologique conservée les cellules TagRFP-CLDN1^{+/+} se sont révélées résistantes à l'infection. De manière intéressante le domaine cytosolique N-terminale de la CLDN1 ne contient que 7 aa et n'a été l'objet d'aucune prédiction fonctionnelle à l'heure actuelle, il représente donc une cible de choix pour l'ajout d'une étiquette. Elle a d'ailleurs été utilisée à de nombreuses reprises pour marquer les protéines CLDN1 (Harris et al. 2008; Shen, Weber, and Turner 2008; Van Itallie, Tietgens, and Anderson 2017). Cependant, les rapports précédents utilisaient uniquement des protéines surexprimées, et la CLDN1 endogène demeurait. Ici, en marquant de manière endogène CLDN1, nous montrons que le marquage N-terminal de la protéine perturbe l'infection par le VHC. Afin de pouvoir utiliser cette lignée cellulaire pour l'étude de la dynamique spatiotemporelle d'interaction VHC-CLDN1, il faudrait déterminer précisément l'étape d'entrée impactée : l'interaction CD81-CLDN1 ou VHC-CD81-CLDN1, l'endocytose du VHC,

le relargage du VHC dans le cytosol ou même si la stratégie d'édition n'a pas impacté intrinsèquement la cellule et rend les autres étapes du cycle viral impossible. Si l'étape impactée est postérieure à l'endocytose ce modèle pourra être validé pour une étude de la dynamique spatiotemporelle d'interaction VHC-CLDN1.

D'un point de vue physiologique ce modèle reste recevable et peut-être utilisé en imagerie en temps réel dans un autre contexte différent de celui du VHC. L'expression de CLDN1 a été proposée pour le pronostic de cancer (Fritzsche et al. 2008) et nos travaux fournissent une nouvelle approche pour évaluer quantitativement celui-ci dans des cellules vivantes. De plus, des anticorps anti-CLDN1 ont été proposés pour le traitement du cancer colorectal et le traitement antiviral du VHC (Cherradi et al. 2017; Mailly et al. 2015), mais leur mode d'action n'est que partiellement compris. Ici, les cellules modifiées TagRFP-CLDN1 fournissent une puissante plateforme pour étudier les propriétés anti-cancéreuses et antivirales des anticorps anti-CLDN1. En outre, des études pharmacologiques et génétiques pourraient également être envisagées sur ces cellules pour évaluer rapidement et de manière fiable la dynamique d'expression et de distribution de CLDN1 en imagerie sur cellules vivantes.

D'autre part, notre méthode de purification et de marquage par fluorescence de particules de VHC répliquatives (HCVcc Jc1^{FLAG-E2}) a permis d'obtenir des particules de VHC fluorescentes (Figure 43). La liaison covalente des fluorophores via le principe de réticulation chimique activée par un ester (NHS-ester) semble avoir un faible impact sur l'infectivité de ces particules, en opposition aux techniques utilisant un traceur lipophile fluorescent DiD entraînant systématiquement une perte d'infectivité avec environ 90% des particules étiquetées purifiées qui ne conduisent pas à une infection productive (Coller et al. 2009 ; Baktash et al. 2018 ; Baktash and Randall 2019). La composition lipidique des particules virales infectieuses du VHC joue un rôle clé dans l'entrée virale (Blaising and Pécheur 2013). Les traceurs lipophiles, en se liant aux lipides et lipoprotéines composant les LVP, pourraient perturber les interactions avec la cellule hôte et ainsi fortement impacter l'infectivité des particules marquées.

II. Etude de la dynamique d'interaction spatiotemporelle VHC-OCLN

Les analyses du recrutement temporel des différents facteurs d'entrée du VHC utilisant des anticorps bloquants dans les cellules HepG2 (surexprimant CD81 et miR122) ont montré que CLDN1 et OCLN sont les derniers facteurs d'entrées requis avant l'internalisation et l'acidification endosomale (Sourisseau et al. 2013). La localisation majeure de l'OCLN et la CLDN1 au niveau des TJs entraîne une représentation dans laquelle les particules virales atterrissent d'abord sur la surface de la cellule, puis glissent à la surface de la cellule vers les TJ (Bartenschlager, Lohmann, and Penin 2013).

Une première étude spatio-temporelle réalisée sur des cellules CD81-EGFP ou GFP-actine surexprimant les cellules Huh7.5 n'a pas permis de démontrer le mouvement dirigé des particules du VHC vers les TJs (Coller et al. 2009), par opposition au virus Coxsackie, pour lequel une redistribution claire des virions entrants vers ces derniers a été démontrée (Coyne and Bergelson 2006). Ces études ont été réalisées sur des monocouches cellulaires et, plus récemment, il a été montré que des particules de VHC incubées avec des cellules de Huh7.5 cultivées en 3D étaient réparties au centre de sphéroïde et se localisaient avec les marqueurs TJ (Baktash et al. 2018), bien que la localisation de l'OCLN dans les TJs ne soit pas une condition préalable à l'infection par le VHC (Lavie et al. 2019).

La seconde étape de mes travaux a consisté à étudier cette dynamique d'interactions VHC-OCLN. Ainsi la validation de la lignée EGFP-OCLN^{+/+} et des particules répliquatives HCVcc-A647 comme modèle d'étude de la dynamique spatiotemporelle d'interaction OCLN-VHC a permis la réalisation de l'imagerie à haute résolution sur cellules vivantes.

Nos premiers résultats sur échantillons fixés ont permis de montrer que le recrutement de l'OCLN sous les particules virales est bien spécifique dans notre modèle, en effet ce phénomène n'est pas observé lorsque des microsphères inertes ont été utilisées (Figure 48). De plus l'analyse de l'imagerie sur cellules fixées et vivantes a montré que le VHC ne glissait pas vers les TJs et, chose surprenante, nous avons constaté qu'OCLN s'éloignait des TJs pour rencontrer le virus (Figure

48-51). A ce stade, nous ne savons pas comment le VHC capture les protéines d'OCLN, mais on peut supposer qu'une faible quantité de protéines d'OCLN diffusant au niveau de la membrane plasmique peut être capturée par le complexe formé par le VHC avec les facteurs d'entrée en amont et s'y accumule, conformément aux modèles précédemment proposés pour d'autres virus (Boulant, Stanifer, and Lozach 2015). Cela pourrait notamment expliquer pourquoi l'internalisation des virions du VHC prend entre 3 et 4 h (Figure 50A).

D'autre part, la génération des lignées EGFP-OCLN^{+/+} KO-CLDN1 pourra nous apporter des indications quant à la dynamique d'association VHC-OCLN vis-à-vis de la CLDN1. En effet, Sourisseau *et al.* ont déterminé la temporalité d'action de ces facteurs dans l'infection par le VHC, l'OCLN serait recruté après la CLDN1 (Sourisseau *et al.* 2013), mais la dynamique d'association de ces facteurs à la surface de la membrane plasmique reste non résolue. Dans ce contexte, l'imagerie en temps réel sur la lignée EGFP-OCLN^{+/+} invalidée génétiquement pour la CLDN1 nous permettrait de l'étudier. En effet, deux hypothèses sont envisageables : la première serait que le recrutement de l'OCLN sous la particule virale est CLDN1 dépendante et son absence l'empêche, ou à l'opposé, le recrutement est indépendant de la CLDN1. En d'autres termes, l'OCLN serait recruté sous la particule virale même en absence de CLDN1.

Le principal problème de notre modèle réside dans le fait que nos cellules sont cultivées sous forme de monocouches, en 2D, exposant ainsi leur face apicale au virus, une topologie opposée aux conditions physiologiques où les hépatocytes exposent leur face basolatérale à la circulation sanguine d'où le virus provient. Récemment, un autre groupe a développé des cellules Huh7.5 en 3D, menant à l'exposition du côté basolatéral des cellules (Baktash *et al.* 2018). Ils ont suggéré que, dans ce contexte, les virions du VHC avaient tendance à glisser vers le centre de la masse cellulaire où se trouvait OCLN et d'autres protéines associées aux TJs, mais ce phénomène a été décrit uniquement sur échantillons fixés. Aucune imagerie directe de la dynamique des interactions VHC-récepteurs n'a été réalisée. On sait que les nano-objets ont tendance à se déplacer vers le centre des organites (Y. Gao *et al.* 2013) en raison d'un *treadmilling effect* qu'on peut traduire « effet de tapis roulant ».

A l'heure actuelle, les modèles 2D et 3D restent complémentaires pour approfondir notre compréhension des interactions VHC-récepteurs. Les travaux récents de Lavie *et al.* montrent que la localisation de l'OCLN aux TJs n'était pas une condition préalable à l'infection par le VHC dans les hépatocytes polarisés (Lavie et al. 2019) et que, par conséquent, au-delà du lieu où le VHC et l'OCLN interagissent (à la TJ ou hors de celle-ci), notre approche nous a permis de déterminer le rôle que pourrait jouer OCLN dans l'entrée virale du VHC. La corrélation entre la vitesse de la particule virale à la membrane et la quantité d'OCLN tend à lui donner un potentiel rôle stabilisateur des particules de VHC au niveau de la membrane plasmique, ce qui favoriserait à son tour l'internalisation du virus et l'infection. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour identifier le déterminant moléculaire responsable de l'immobilisation du virus dépendant de OCLN (Figure 53)

CONCLUSION GENERALE

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis dans un premier temps de générer de nouveaux outils biologiques pour l'imagerie en temps réel qui pourront être utiles à l'ensemble de la communauté travaillant sur le VHC, ainsi que celle intéressée par la biologie cellulaire des jonctions serrées. La bio-ingénierie de cellules Huh7.5.1 à l'aide du système CRISPR/Cas9 a permis l'obtention de lignées cellulaires stables exprimant un niveau endogène des récepteurs en fusion à une étiquette fluorescente : TagRFP-CLDN1^{+/+} et EGFP-OCLN^{+/+} sans présence de protéine « fantôme » non fluorescente. De plus, l'insertion des étiquettes fluorescentes n'impacte pas la fonction physiologique des TJs. En effet, Les cellules EGFP-OCLN^{+/+} et TagRFP-CDLN1^{+/+} ont des caractéristiques de localisation, d'expression protéique et de perméabilité épithéliale similaires aux cellules sauvages. Cependant celles-ci impactent la permissivité des lignées au VHC, ainsi la lignée TagRFP-CLDN1^{+/+} est devenue résistante à l'infection. Cependant la lignée EGFP-OCLN^{+/+} reste permissive aux VHC. Des lignées invalidées génétiquement pour CLDN1 ont pu être générées à partir de cette lignée. Pour finir le développement d'une méthode de purification et de marquage par fluorescence de particules de VHC répliquative (HCVcc Jc1^{FLAG-E2}) a permis d'obtenir des particules de VHC fluorescentes infectieuses.

Dans un second temps, mes travaux ont permis d'étudier la dynamique spatiotemporelle de l'interaction VHC-OCLN. L'imagerie sur échantillons fixés et vivants de la lignée EGFP-OCLN^{+/+} et des particules de VHC répliquatives fluorescentes, couplées à des quantifications ont montré que l'interaction VHC-OCLN à lieu en dehors des TJs dans notre modèle cellulaire. De plus, elle a mis en évidence que l'accumulation de l'OCLN sous la particule entraîne une diminution de la vitesse du complexe VHC-OCLN mettant en lumière un potentiel nouveau rôle de l'OCLN dans la stabilisation du virion à la membrane plasmique.

Bibliographie

A

- Adair, Richard, Arvind H. Patel, Lynsey Corless, Stephen Griffin, David J. Rowlands, and Christopher J. McCormick. 2009. 'Expression of Hepatitis C Virus (HCV) Structural Proteins in Trans Facilitates Encapsidation and Transmission of HCV Subgenomic RNA'. *The Journal of General Virology* 90 (Pt 4): 833–42. <https://doi.org/10.1099/vir.2008.006049-0>.
- Agnello, Vincent, György Ábel, Mutasim Elfahal, Glenn B. Knight, and Qing-Xiu Zhang. 1999. 'Hepatitis C Virus and Other Flaviviridae Viruses Enter Cells via Low Density Lipoprotein Receptor'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (22): 12766–71.
- Akazawa, Daisuke, Masaki Moriyama, Hiroshi Yokokawa, Noriaki Omi, Noriyuki Watanabe, Tomoko Date, Kenichi Morikawa, et al. 2013. 'Neutralizing Antibodies Induced by Cell Culture-Derived Hepatitis C Virus Protect against Infection in Mice'. *Gastroenterology* 145 (2): 447-455.e1-4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.007>.
- Albecka, Anna, Sandrine Belouzard, Anne Op de Beeck, Véronique Descamps, Lucie Goueslain, Justine Bertrand-Michel, François Tercé, Gilles Duverlie, Yves Rouillé, and Jean Dubuisson. 2012. 'Role of Low-Density Lipoprotein Receptor in the Hepatitis C Virus Life Cycle'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (4): 998–1007. <https://doi.org/10.1002/hep.25501>.
- Ali, N., and A. Siddiqui. 1995. 'Interaction of Polypyrimidine Tract-Binding Protein with the 5' Noncoding Region of the Hepatitis C Virus RNA Genome and Its Functional Requirement in Internal Initiation of Translation'. *Journal of Virology* 69 (10): 6367–75.
- Ali, N., and A. Siddiqui. 1997. 'The La Antigen Binds 5' Noncoding Region of the Hepatitis C Virus RNA in the Context of the Initiator AUG Codon and Stimulates Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (6): 2249–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2249>.
- Alric, L., M. Fort, J. Izopet, J. P. Vinel, J. P. Charlet, J. Selves, J. Puel, J. P. Pascal, M. Duffaut, and M. Abbal. 1997. 'Genes of the Major Histocompatibility Complex Class II Influence the Outcome of Hepatitis C Virus Infection'. *Gastroenterology* 113 (5): 1675–81. <https://doi.org/10.1053/gast.1997.v113.pm9352872>.
- Alshbool, Fatima. Z., and Subburaman Mohan. 2014. 'Emerging Multifunctional Roles of Claudin Tight Junction Proteins in Bone'. *Endocrinology* 155 (7): 2363–76. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1173>.
- Alter, H. J., R. H. Purcell, P. V. Holland, and H. Popper. 1978. 'Transmissible Agent in Non-A, Non-B Hepatitis'. *Lancet (London, England)* 1 (8062): 459–63. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(78\)90131-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(78)90131-9).
- Alter, Harvey J., Robert H. Purcell, James W. Shih, Jacqueline C. Melpolder, Michael Houghton, Qui-Lim Choo, and George Kuo. 1989. 'Detection of Antibody to Hepatitis C Virus in Prospectively Followed Transfusion Recipients with Acute and Chronic Non-A, Non-B Hepatitis'. *New England Journal of Medicine* 321 (22): 1494–1500. <https://doi.org/10.1056/NEJM198911303212202>.
- Alter, Miriam J. 2007. 'Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection'. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 13 (17): 2436–41. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i17.2436>.
- Alter, Miriam J., Stephen C. Hadler, Franklyn N. Judson, Allene Mares, W. James Alexander, Pin Ya Hu, Joan K. Miller, et al. 1990. 'Risk Factors for Acute Non-A, Non-B Hepatitis in the United States and Association With Hepatitis C Virus Infection'. *JAMA* 264 (17): 2231–35. <https://doi.org/10.1001/jama.1990.03450170079026>.
- André, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J. L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Bréchet, G. Paranhos-Baccalà, and V. Lotteau. 2002. 'Characterization of Low- and Very-Low-Density

- Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles'. *Journal of Virology* 76 (14): 6919–28. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.14.6919-6928.2002>.
- Appel, Nicole, Thomas Pietschmann, and Ralf 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'. *Journal of Virology* 79 (5): 3187–94. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.3187-3194.2005>.
- Appel, Nicole, Margarita Zayas, Sven Miller, Jacomine Krijnse-Locker, Torsten Schaller, Peter Friebe, Stephanie Kallis, Ulrike Engel, and Ralf Bartenschlager. 2008. 'Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly'. *PLoS Pathogens* 4 (3): e1000035. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000035>.
- Arnaud, Noëlla, Stéphanie Dabo, Daisuke Akazawa, Masayoshi Fukasawa, Fumiko Shinkai-Ouchi, Jacques Hugon, Takaji Wakita, and Eliane F. Meurs. 2011. 'Hepatitis C Virus Reveals a Novel Early Control in Acute Immune Response'. *PLoS Pathogens* 7 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002289>.
- Arnaud, Noëlla, Stéphanie Dabo, Patrick Maillard, Agata Budkowska, Katerina I. Kalliampakou, Penelope Mavromara, Dominique Garcin, et al. 2010. 'Hepatitis C Virus Controls Interferon Production through PKR Activation'. *PloS One* 5 (5): e10575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010575>.

B

- Bacon, Bruce R., Stuart C. Gordon, Eric Lawitz, Patrick Marcellin, John M. Vierling, Stefan Zeuzem, Fred Poordad, et al. 2011. 'Boceprevir for Previously Treated Chronic HCV Genotype 1 Infection'. *The New England Journal of Medicine* 364 (13): 1207–17. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1009482>.
- Bai, Yun, Kaihong Zhou, and Jennifer A. Doudna. 2013. 'Hepatitis C Virus 3'UTR Regulates Viral Translation through Direct Interactions with the Host Translation Machinery'. *Nucleic Acids Research* 41 (16): 7861–74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt543>.
- Baktash, Yasmine, Anisha Madhav, Kelly E. Collier, and Glenn Randall. 2018. 'Single Particle Imaging of Polarized Hepatoma Organoids upon Hepatitis C Virus Infection Reveals an Ordered and Sequential Entry Process'. *Cell Host & Microbe* 23 (3): 382-394.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.02.005>.
- Baktash, Yasmine, and Glenn Randall. 2019. 'Live Cell Imaging of Hepatitis C Virus Trafficking in Hepatocytes'. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1911: 263–74. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8976-8_18.
- Balda, M. S., C. Flores-Maldonado, M. Cerejido, and K. Matter. 2000. 'Multiple Domains of Occludin Are Involved in the Regulation of Paracellular Permeability'. *Journal of Cellular Biochemistry* 78 (1): 85–96.
- Bamforth, S. D., U. Kniesel, H. Wolburg, B. Engelhardt, and W. Risau. 1999. 'A Dominant Mutant of Occludin Disrupts Tight Junction Structure and Function'. *Journal of Cell Science* 112 (Pt 12) (June): 1879–88.
- Banerjee, D., and K. R. Reddy. 2016. 'Review Article: Safety and Tolerability of Direct-Acting Anti-Viral Agents in the New Era of Hepatitis C Therapy'. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 43 (6): 674–96. <https://doi.org/10.1111/apt.13514>.
- Bankwitz, Dorothea, Eike Steinmann, Julia Bitzegeio, Sandra Ciesek, Martina Friesland, Eva Herrmann, Mirjam B. Zeisel, et al. 2010. 'Hepatitis C Virus Hypervariable Region 1 Modulates Receptor Interactions, Conceals the CD81 Binding Site, and Protects Conserved Neutralizing Epitopes'. *Journal of Virology* 84 (11): 5751–63. <https://doi.org/10.1128/JVI.02200-09>.
- Baril, Martin, Marie-Eve Racine, François Penin, and Daniel Lamarre. 2009. 'MAVS Dimer Is a Crucial Signaling Component of Innate Immunity and the Target of Hepatitis C Virus NS3/4A Protease'. *Journal of Virology* 83 (3): 1299–1311. <https://doi.org/10.1128/JVI.01659-08>.

- Barrera, Josep M., Miguel Bruguera, M. Guadalupe Ercilla, Cristina Gil, Raquel Celis, M. Pilar Gil, M. Valle Del Onorato, Joan Rodés, and Antoni Ordinas. 1995. 'Persistent Hepatitis C Viremia after Acute Self-Limiting Posttransfusion Hepatitis C'. *Hepatology* 21 (3): 639–44. <https://doi.org/10.1002/hep.1840210306>.
- Bartenschlager, Ralf, Volker Lohmann, and Francois Penin. 2013. 'The Molecular and Structural Basis of Advanced Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection'. *Nature Reviews. Microbiology* 11 (7): 482–96. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3046>.
- Barth, Heidi, Christiane Schafer, Mohammed I. Adah, Fuming Zhang, Robert J. Linhardt, Hidenao Toyoda, Akiko Kinoshita-Toyoda, et al. 2003. 'Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate'. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (42): 41003–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302267200>.
- Bartosch, Birke, Jean Dubuisson, and François-Loïc Cosset. 2003. 'Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-Particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes'. *The Journal of Experimental Medicine* 197 (5): 633–42. <https://doi.org/10.1084/jem.20021756>.
- Bartosch, Birke, Géraldine Verney, Marlène Dreux, Peggy Donot, Yoann Morice, François Penin, Jean-Michel Pawlotsky, Dimitri Lavillette, and Francois-Loïc 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'. *Journal of Virology* 79 (13): 8217–29. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8217-8229.2005>.
- Bartosch, Birke, Alessandra Vitelli, Christelle Granier, Caroline Goujon, Jean Dubuisson, Simona Pascale, Elisa Scarselli, Riccardo Cortese, Alfredo Nicosia, and François-Loïc Cosset. 2003. 'Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-Receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor'. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (43): 41624–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305289200>.
- Bataller, Ramón, and David A. Brenner. 2005. 'Liver Fibrosis'. *The Journal of Clinical Investigation* 115 (2): 209–18. <https://doi.org/10.1172/JCI24282>.
- Behrens, S E, L Tomei, and R De Francesco. 1996. 'Identification and Properties of the RNA-Dependent RNA Polymerase of Hepatitis C Virus.' *The EMBO Journal* 15 (1): 12–22.
- Benedicto, Ignacio, Francisca Molina-Jiménez, Olga Barreiro, Alejandra Maldonado-Rodríguez, Jesús Prieto, Ricardo Moreno-Otero, Rafael Aldabe, Manuel López-Cabrera, and Pedro 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 (Baltimore, Md.)* 48 (4): 1044–53. <https://doi.org/10.1002/hep.22465>.
- Benedicto, Ignacio, Francisca Molina-Jiménez, Birke Bartosch, François-Loïc Cosset, Dimitri Lavillette, Jesús Prieto, Ricardo Moreno-Otero, et al. 2009. 'The Tight Junction-Associated Protein Occludin Is Required for a Postbinding Step in Hepatitis C Virus Entry and Infection'. *Journal of Virology* 83 (16): 8012–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00038-09>.
- Bissig, Karl-Dimiter, Stefan F. Wieland, Phu Tran, Masanori Isogawa, Tam T. Le, Francis V. Chisari, and Inder M. Verma. 2010. 'Human Liver Chimeric Mice Provide a Model for Hepatitis B and C Virus Infection and Treatment'. *The Journal of Clinical Investigation* 120 (3): 924–30. <https://doi.org/10.1172/JCI40094>.
- Bitzegeio, Julia, Dorothea Bankwitz, Kathrin Hueging, Sibylle Haid, Christiane Brohm, Mirjam B. Zeisel, Eva Herrmann, et al. 2010. 'Adaptation of Hepatitis C Virus to Mouse CD81 Permits Infection of Mouse Cells in the Absence of Human Entry Factors'. *PLoS Pathogens* 6 (July): e1000978. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000978>.
- Blaising, Julie, Pierre L. Lévy, Claire Gondeau, Capucine Phelip, Mihayl Varbanov, Elodie Teissier, Florence Ruggiero, et al. 2013. 'Silibinin Inhibits Hepatitis C Virus Entry into Hepatocytes by Hindering Clathrin-Dependent Trafficking'. *Cellular Microbiology* 15 (11): 1866–82. <https://doi.org/10.1111/cmi.12155>.
- Blaising, Julie, and Eve-Isabelle Pécheur. 2013. 'Lipids: A Key for Hepatitis C Virus Entry and a Potential Target for Antiviral Strategies'. *Biochimie* 95 (1): 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.07.016>.

- Blanchard, Emmanuelle, Sandrine Belouzard, Lucie Goueslain, Takaji Wakita, Jean Dubuisson, Czeslaw Wychowski, and Yves Rouillé. 2006. 'Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis'. *Journal of Virology* 80 (14): 6964–72. <https://doi.org/10.1128/JVI.00024-06>.
- Blanchet, Matthieu, Nabil G. Seidah, and Patrick Labonté. 2012. 'SKI-1/S1P Inhibition: A Promising Surrogate to Statins to Block Hepatitis C Virus Replication'. *Antiviral Research* 95 (2): 159–66. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.05.006>.
- Blight, Keril J., Jane A. McKeating, and Charles M. Rice. 2002. 'Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication'. *Journal of Virology* 76 (24): 13001–14. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.13001-13014.2002>.
- Bode, Johannes G., Stephan Ludwig, Christina Ehrhardt, Ute Albrecht, Andreas Erhardt, Fred Schaper, Peter C. Heinrich, and Dieter Häussinger. 2003. 'IFN-Alpha Antagonistic Activity of HCV Core Protein Involves Induction of Suppressor of Cytokine Signaling-3'. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (3): 488–90. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0664fje>.
- Boettler, Tobias, Hans Christian Spangenberg, Christoph Neumann-Haefelin, Elisabeth Panther, Simonetta Urbani, Carlo Ferrari, Hubert E. Blum, Fritz von Weizsäcker, and Robert Thimme. 2005. 'T Cells with a CD4+CD25+ Regulatory Phenotype Suppress in Vitro Proliferation of Virus-Specific CD8+ T Cells during Chronic Hepatitis C Virus Infection'. *Journal of Virology* 79 (12): 7860–67. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7860-7867.2005>.
- Bolognesi, Benedetta, and Ben Lehner. 2018. 'Reaching the Limit'. *ELife* 7 (August): e39804. <https://doi.org/10.7554/eLife.39804>.
- Borgia, Sergio M., Charlotte Hedskog, Bandita Parhy, Robert H. Hyland, Luisa M. Stamm, Diana M. Brainard, Mani G. Subramanian, et al. 2018. 'Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes'. *The Journal of Infectious Diseases* 218 (11): 1722–29. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy401>.
- Boson, Bertrand, Ophélie Granio, Ralf Bartenschlager, and François-Loïc 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002144>.
- Boulant, Steeve, Roland Montserret, R. Graham Hope, Maxime Ratinier, Paul Targett-Adams, Jean-Pierre Lavergne, Francois Penin, and John McLauchlan. 2006. 'Structural Determinants That Target the Hepatitis C Virus Core Protein to Lipid Droplets'. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (31): 22236–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601031200>.
- Boulant, Steeve, Megan Stanifer, and Pierre-Yves Lozach. 2015. 'Dynamics of Virus-Receptor Interactions in Virus Binding, Signaling, and Endocytosis'. *Viruses* 7 (6): 2794–2815. <https://doi.org/10.3390/v7062747>.
- Boulant, Steeve, Paul Targett-Adams, and John McLauchlan. 2007. 'Disrupting the Association of Hepatitis C Virus Core Protein with Lipid Droplets Correlates with a Loss in Production of Infectious Virus'. *The Journal of General Virology* 88 (Pt 8): 2204–13. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82898-0>.
- Boulant, Steeve, Christophe Vanbelle, Christine Ebel, François Penin, and Jean-Pierre Lavergne. 2005. 'Hepatitis C Virus Core Protein Is a Dimeric Alpha-Helical Protein Exhibiting Membrane Protein Features'. *Journal of Virology* 79 (17): 11353–65. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11353-11365.2005>.
- Bowen, David G., and Christopher M. Walker. 2005. 'Mutational Escape from CD8+ T Cell Immunity'. *The Journal of Experimental Medicine* 201 (11): 1709–14. <https://doi.org/10.1084/jem.20050808>.
- 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'. *Journal of Medical Virology* 34 (3): 206–8. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890340315>.

- Bradley, D. W., K. A. McCaustland, E. H. Cook, C. A. Schable, J. W. Ebert, and J. E. Maynard. 1985. 'Posttransfusion Non-A, Non-B Hepatitis in Chimpanzees. Physicochemical Evidence That the Tubule-Forming Agent Is a Small, Enveloped Virus'. *Gastroenterology* 88 (3): 773–79.
- Brass, Volker, Jan Martin Berke, Roland Montserret, Hubert E. Blum, François Penin, and Darius Moradpour. 2008. 'Structural Determinants for Membrane Association and Dynamic Organization of the Hepatitis C Virus NS3-4A Complex'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (38): 14545–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807298105>.
- Bressanelli, Stéphane, Licia Tomei, Alain Roussel, Ilario Incitti, Rosa Letizia Vitale, Magali Mathieu, Raffaele De Francesco, and Félix A. Rey. 1999. 'Crystal Structure of the RNA-Dependent RNA Polymerase of Hepatitis C Virus'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23): 13034–39.
- Brimacombe, Claire L., Joe Grove, Luke W. Meredith, Ke Hu, Andrew J. Syder, Maria Victoria Flores, Jennifer M. Timpe, et al. 2011. 'Neutralizing Antibody-Resistant Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission'. *Journal of Virology* 85 (1): 596–605. <https://doi.org/10.1128/JVI.01592-10>.
- Brown, E. A., H. Zhang, L. H. Ping, and S. M. Lemon. 1992. 'Secondary Structure of the 5' Nontranslated Regions of Hepatitis C Virus and Pestivirus Genomic RNAs'. *Nucleic Acids Research* 20 (19): 5041–45. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.5041>.
- Bukh, J., R. H. Miller, and R. H. Purcell. 1995. 'Genetic Heterogeneity of Hepatitis C Virus: Quasispecies and Genotypes'. *Seminars in Liver Disease* 15 (1): 41–63. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1007262>.
- Bukong, Terence N., Karen Kodys, and Gyongyi Szabo. 2013. 'Human Ezrin-Moesin-Radixin Proteins Modulate Hepatitis C Virus Infection'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 58 (5): 1569–79. <https://doi.org/10.1002/hep.26500>.

C

- Cacoub, Patrice, Cloe Comarmond, Fanny Domont, Léa Savey, Anne C. Desbois, and David Saadoun. 2016. 'Extrahepatic Manifestations of Chronic Hepatitis C Virus Infection'. *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 3 (1): 3–14. <https://doi.org/10.1177/2049936115585942>.
- Cacoub, Patrice, Thierry Poynard, Pascale Ghillani, Frederic Charlotte, Martine Olivi, Jean Charles Piette, and Pierre Opolon. 1999. 'Extrahepatic Manifestations of Chronic Hepatitis C'. *Arthritis & Rheumatism* 42 (10): 2204–12. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199910\)42:10<2204::AID-ANR24>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199910)42:10<2204::AID-ANR24>3.0.CO;2-D).
- Callens, Nathalie, Yann Ciczora, Birke Bartosch, Ngoc Vu-Dac, François-Loïc Cosset, Jean-Michel Pawlotsky, François Penin, and Jean Dubuisson. 2005. 'Basic Residues in Hypervariable Region 1 of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Contribute to Virus Entry'. *Journal of Virology* 79 (24): 15331–41. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15331-15341.2005>.
- Cao, Xuezhi, Qiang Ding, Jie Lu, Wanyin Tao, Bing Huang, Yanan Zhao, Junqi Niu, Yong-Jun Liu, and Jin Zhong. 2015. 'MDA5 Plays a Critical Role in Interferon Response during Hepatitis C Virus Infection'. *Journal of Hepatology* 62 (4): 771–78. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.007>.
- Carpenter, G., K. J. Lembach, M. M. Morrison, and S. Cohen. 1975. 'Characterization of the Binding of 125-I-Labeled Epidermal Growth Factor to Human Fibroblasts'. *The Journal of Biological Chemistry* 250 (11): 4297–4304.
- Carrère-Kremer, Séverine, Claire Montpelliier-Pala, Laurence Cocquerel, Czeslaw Wychowski, François Penin, and Jean Dubuisson. 2002. 'Subcellular Localization and Topology of the P7 Polypeptide of Hepatitis C Virus'. *Journal of Virology* 76 (8): 3720–30. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.8.3720-3730.2002>.
- Carroll, Steven S., Steven Ludmerer, Larry Handt, Kenneth Koeplinger, Nanyan Rena Zhang, Donald Graham, Mary-Ellen Davies, Malcolm MacCoss, Daria Hazuda, and David B. Olsen. 2009. 'Robust Antiviral Efficacy upon Administration of a Nucleoside Analog to Hepatitis C Virus-

- Infected Chimpanzees'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (3): 926–34. <https://doi.org/10.1128/AAC.01032-08>.
- Catanese, Maria Teresa, and Marcus Dorner. 2015. 'Advances in Experimental Systems to Study Hepatitis C Virus in Vitro and in Vivo'. *Virology*, 60th Anniversary Issue, 479–480 (May): 221–33. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.014>.
- Catanese, Maria Teresa, Kunihiro Uryu, Martina Kopp, Thomas J. Edwards, Linda Andrus, William J. Rice, Mariena Silvestry, Richard J. Kuhn, and Charles M. Rice. 2013. 'Ultrastructural Analysis of Hepatitis C Virus Particles'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (23): 9505–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307527110>.
- Chandler, Danielle E., François Penin, Klaus Schulten, and Christophe Chipot. 2012. 'The P7 Protein of Hepatitis C Virus Forms Structurally Plastic, Minimalist Ion Channels'. *PLoS Computational Biology* 8 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002702>.
- Chang, Kyung-Soo, Jieyun Jiang, Zhaohui Cai, and Guangxiang Luo. 2007. 'Human Apolipoprotein e Is Required for Infectivity and Production of Hepatitis C Virus in Cell Culture'. *Journal of Virology* 81 (24): 13783–93. <https://doi.org/10.1128/JVI.01091-07>.
- Chassey, B. de, V. Navratil, L. Tafforeau, M. S. Hiet, A. Aublin-Gex, S. Agaugué, G. Meiffren, et al. 2008. 'Hepatitis C Virus Infection Protein Network'. *Molecular Systems Biology* 4: 230. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.66>.
- Chen, Jizheng, Yang Zhao, Chao Zhang, Hairong Chen, Jin Feng, Xiumei Chi, Yu Pan, et al. 2014. 'Persistent Hepatitis C Virus Infections and Hepatopathological Manifestations in Immune-Competent Humanized Mice'. *Cell Research* 24 (9): 1050–66. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.116>.
- Chen, Y., C. Merzdorf, D. L. Paul, and D. A. Goodenough. 1997. 'COOH Terminus of Occludin Is Required for Tight Junction Barrier Function in Early *Xenopus* Embryos'. *The Journal of Cell Biology* 138 (4): 891–99. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.4.891>.
- Cheng, J. C., M. F. Chang, and S. C. Chang. 1999. 'Specific Interaction between the Hepatitis C Virus NS5B RNA Polymerase and the 3' End of the Viral RNA'. *Journal of Virology* 73 (8): 7044–49.
- Cheng, Jun-Jun, Jian-Rui Li, Meng-Hao Huang, Lin-Lin Ma, Zhou-Yi Wu, Chen-Chen Jiang, Wen-Jing Li, et al. 2016. 'CD36 Is a Co-Receptor for Hepatitis C Virus E1 Protein Attachment'. *Scientific Reports* 6 (February): 21808. <https://doi.org/10.1038/srep21808>.
- Cherradi, S., A. Ayrolles-Torro, N. Vezzo-Vié, N. Gueguinou, V. Denis, E. Combes, F. Boissière, et al. 2017. 'Antibody Targeting of Claudin-1 as a Potential Colorectal Cancer Therapy'. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 36 (1): 89. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0558-5>.
- Chevaliez, S. 2011. 'Virological Tools to Diagnose and Monitor Hepatitis C Virus Infection'. *Clinical Microbiology and Infection* 17 (2): 116–21. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03418.x>.
- Choi, Youkyung H., Nancy Jin, Fiona Kelly, SenthilKumar K. Sakthivel, and Tianwei Yu. 2016. 'Elevation of Alanine Aminotransferase Activity Occurs after Activation of the Cell-Death Signaling Initiated by Pattern-Recognition Receptors but before Activation of Cytolytic Effectors in NK or CD8+ T Cells in the Liver During Acute HCV Infection'. *PLoS One* 11 (10): e0165533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165533>.
- Chong, K L, L Feng, K Schappert, E Meurs, T F Donahue, J D Friesen, A G Hovanessian, and B R Williams. 1992. 'Human P68 Kinase Exhibits Growth Suppression in Yeast and Homology to the Translational Regulator GCN2.' *The EMBO Journal* 11 (4): 1553–62.
- 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 (New York, N.Y.)* 244 (4902): 359–62. <https://doi.org/10.1126/science.2523562>.
- Chou, Yi-Ying, Christian Cuevas, Margot Carocci, Sarah H. Stubbs, Minghe Ma, David K. Cureton, Luke Chao, et al. 2016. 'Identification and Characterization of a Novel Broad-Spectrum Virus Entry Inhibitor'. *Journal of Virology* 90 (9): 4494–4510. <https://doi.org/10.1128/JVI.00103-16>.

- Chung, Nancy S., and Kishor M. Wasan. 2004. 'Potential Role of the Low-Density Lipoprotein Receptor Family as Mediators of Cellular Drug Uptake'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (9): 1315–34. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.12.003>.
- Cinelli, R. A., A. Ferrari, V. Pellegrini, M. Tyagi, M. Giacca, and F. Beltram. 2000. 'The Enhanced Green Fluorescent Protein as a Tool for the Analysis of Protein Dynamics and Localization: Local Fluorescence Study at the Single-Molecule Level'. *Photochemistry and Photobiology* 71 (6): 771–76. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)071<0771:tegfpa>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)071<0771:tegfpa>2.0.co;2).
- Clarke, Dean, Stephen Griffin, Lucy Beales, Corine St Gelais, Stan Burgess, Mark Harris, and David Rowlands. 2006. 'Evidence for the Formation of a Heptameric Ion Channel Complex by the Hepatitis C Virus P7 Protein in Vitro'. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (48): 37057–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602434200>.
- Clément, Sophie, Catherine Fauvelle, Emilie Branche, Vincent Kaddai, Stéphanie Conzelmann, Tujana Boldanova, Birke Bartosch, Kaori Minehira, and Francesco Negro. 2013. 'Role of Seipin in Lipid Droplet Morphology and Hepatitis C Virus Life Cycle'. *The Journal of General Virology* 94 (Pt 10): 2208–14. <https://doi.org/10.1099/vir.0.054593-0>.
- Clément, Sophie, Stéphanie Pascarella, Stéphanie Conzelmann, Carmen Gonelle-Gispert, Kévin Guilloux, and Francesco Negro. 2010. 'The Hepatitis C Virus Core Protein Indirectly Induces Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in Hepatic Stellate Cells via Interleukin-8'. *Journal of Hepatology* 52 (5): 635–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.10.035>.
- Coburn, Craig A., Peter T. Meinke, Wei Chang, Christine M. Fandozzi, Donald J. Graham, Bin Hu, Qian Huang, et al. 2013. 'Discovery of MK-8742: An HCV NS5A Inhibitor with Broad Genotype Activity'. *ChemMedChem* 8 (12): 1930–40. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300343>.
- Cocquerel, Laurence, Anne Op de Beeck, Michel Lambot, Juliette Roussel, David Delgrange, André Pillez, Czeslaw Wychowski, François Penin, and Jean Dubuisson. 2002. 'Topological Changes in the Transmembrane Domains of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins'. *The EMBO Journal* 21 (12): 2893–2902. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf295>.
- Codran, Audrey, Cathy Royer, Daniel Jaeck, Michèle Bastien-Valle, Thomas F. Baumert, Marie Paule Kieny, Carlos Augusto Pereira, and Jean-Pierre Martin. 2006. 'Entry of Hepatitis C Virus Pseudotypes into Primary Human Hepatocytes by Clathrin-Dependent Endocytosis'. *The Journal of General Virology* 87 (Pt 9): 2583–93. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81710-0>.
- Coenen, Martin, Hans Dieter Nischalke, Benjamin Krämer, Bettina Langhans, Andreas Glässner, Daniela Schulte, Christian Körner, Tilman Sauerbruch, Jacob Nattermann, and Ulrich Spengler. 2011. 'Hepatitis C Virus Core Protein Induces Fibrogenic Actions of Hepatic Stellate Cells via Toll-like Receptor 2'. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 91 (9): 1375–82. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.78>.
- Cohen, S. 1965. 'The Stimulation of Epidermal Proliferation by a Specific Protein (EGF)'. *Developmental Biology* 12 (3): 394–407. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(65\)90005-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(65)90005-9).
- Cohen, S., G. Carpenter, and L. King. 1980. 'Epidermal Growth Factor-Receptor-Protein Kinase Interactions. Co-Purification of Receptor and Epidermal Growth Factor-Enhanced Phosphorylation Activity'. *The Journal of Biological Chemistry* 255 (10): 4834–42.
- Coller, Kelly E., Kristi L. Berger, Nicholas S. Heaton, Jacob D. Cooper, Rosa Yoon, and Glenn Randall. 2009. 'RNA Interference and Single Particle Tracking Analysis of Hepatitis C Virus Endocytosis'. *PLoS Pathogens* 5 (12): e1000702. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000702>.
- Conrad, K. Dominik, Florian Giering, Corinna Erfurth, Angelina Neumann, Carmen Fehr, Gunter Meister, and Michael Niepmann. 2013. 'MicroRNA-122 Dependent Binding of Ago2 Protein to Hepatitis C Virus RNA Is Associated with Enhanced RNA Stability and Translation Stimulation'. *PloS One* 8 (2): e56272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056272>.
- Cooper, S., A. L. Erickson, E. J. Adams, J. Kansopon, A. J. Weiner, D. Y. Chien, M. Houghton, P. Parham, and C. M. Walker. 1999. 'Analysis of a Successful Immune Response against Hepatitis C Virus'. *Immunity* 10 (4): 439–49. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80044-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80044-8).

- Corless, J. K., and H. M. Middleton. 1983. 'Normal Liver Function. A Basis for Understanding Hepatic Disease'. *Archives of Internal Medicine* 143 (12): 2291–94. <https://doi.org/10.1001/archinte.143.12.2291>.
- Cormier, Emmanuel G., Fay Tsamis, Francis Kajumo, Robert J. Durso, Jason P. Gardner, and Tatjana Dragic. 2004. 'CD81 Is an Entry Coreceptor for Hepatitis C Virus'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (19): 7270–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402253101>.
- Cox, Andrea L., Timothy Mosbruger, Georg M. Lauer, Drew Pardoll, David L. Thomas, and Stuart C. Ray. 2005. 'Comprehensive Analyses of CD8+ T Cell Responses during Longitudinal Study of Acute Human Hepatitis C'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 42 (1): 104–12. <https://doi.org/10.1002/hep.20749>.
- Cox, Andrea L., Dale M. Netski, Timothy Mosbruger, Susan G. Sherman, Steffanie Strathdee, Danielle Ompad, David Vlahov, et al. 2005. 'Prospective Evaluation of Community-Acquired Acute-Phase Hepatitis C Virus Infection'. *Clinical Infectious Diseases* 40 (7): 951–58. <https://doi.org/10.1086/428578>.
- Coyne, Carolyn B., and Jeffrey M. Bergelson. 2006. 'Virus-Induced Abl and Fyn Kinase Signals Permit Cocksackievirus Entry through Epithelial Tight Junctions'. *Cell* 124 (1): 119–31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.035>.
- Cristofari, Gaël, Roland Ivanyi-Nagy, Caroline Gabus, Steeve Boulant, Jean-Pierre Lavergne, François Penin, and Jean-Luc 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 Research* 32 (8): 2623–31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh579>.
- Crouchet, Emilie, Florian Wrensch, Catherine Schuster, Mirjam B. Zeisel, and Thomas F. Baumert. 2018. 'Host-Targeting Therapies for Hepatitis C Virus Infection: Current Developments and Future Applications'. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 11: 1756284818759483. <https://doi.org/10.1177/1756284818759483>.
- Cukierman, Lisa, Laurent Meertens, Claire Bertaux, Francis Kajumo, and Tatjana Dragic. 2009. 'Residues in a Highly Conserved Claudin-1 Motif Are Required for Hepatitis C Virus Entry and Mediate the Formation of Cell-Cell Contacts'. *Journal of Virology* 83 (11): 5477–84. <https://doi.org/10.1128/JVI.02262-08>.
- Cummins, Philip M. 2012. 'Occludin: One Protein, Many Forms'. *Molecular and Cellular Biology* 32 (2): 242–50. <https://doi.org/10.1128/MCB.06029-11>.
- Cureton, David K., Ramiro H. Massol, Saveez Saffarian, Tomas L. Kirchhausen, and Sean P. J. Whelan. 2009. 'Vesicular Stomatitis Virus Enters Cells through Vesicles Incompletely Coated with Clathrin That Depend upon Actin for Internalization'. *PLoS Pathogens* 5 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000394>.

D

- Dalagiorgou, G., N. Vassilaki, P. Foka, A. Boumlic, A. Kakkanas, E. Kochlios, S. Khalili, et al. 2011. 'High Levels of HCV Core+1 Antibodies in HCV Patients with Hepatocellular Carcinoma'. *The Journal of General Virology* 92 (Pt 6): 1343–51. <https://doi.org/10.1099/vir.0.023010-0>.
- Dansako, Hiromichi, Daisuke Yamane, Christoph Welsch, David R. McGivern, Fengyu Hu, Nobuyuki Kato, and Stanley M. Lemon. 2013. 'Class A Scavenger Receptor 1 (MSR1) Restricts Hepatitis C Virus Replication by Mediating Toll-like Receptor 3 Recognition of Viral RNAs Produced in Neighboring Cells'. *PLoS Pathogens* 9 (5): e1003345. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003345>.
- Danta, Mark, David Brown, Sanjay Bhagani, Oliver G. Pybus, Caroline A. Sabin, Mark Nelson, Martin Fisher, Anne M. Johnson, Geoffrey M. Dusheiko, and HIV and Acute HCV (HAAC) group. 2007. 'Recent Epidemic of Acute Hepatitis C Virus in HIV-Positive Men Who Have Sex with Men Linked to High-Risk Sexual Behaviours'. *AIDS (London, England)* 21 (8): 983–91. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3281053a0c>.

- Dao Thi, Viet Loan, Christelle Granier, Mirjam B. Zeisel, Maryse Guérin, Jimmy Mancip, Ophélie Granio, François Penin, et al. 2012. 'Characterization of Hepatitis C Virus Particle Subpopulations Reveals Multiple Usage of the Scavenger Receptor BI for Entry Steps'. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (37): 31242–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365924>.
- Davis, Gary L., Luis A. Balart, Eugene R. Schiff, Karen Lindsay, Henry C. Bodenheimer, Robert P. Perrillo, William Carey, et al. 1989. 'Treatment of Chronic Hepatitis C with Recombinant Interferon Alfa'. *New England Journal of Medicine* 321 (22): 1501–6. <https://doi.org/10.1056/NEJM198911303212203>.
- Day, Cheryl L., Georg M. Lauer, Gregory K. Robbins, Barbara McGovern, Alysse G. Wurcel, Rajesh T. Gandhi, Raymond T. Chung, and Bruce D. Walker. 2002. 'Broad Specificity of Virus-Specific CD4+ T-Helper-Cell Responses in Resolved Hepatitis C Virus Infection'. *Journal of Virology* 76 (24): 12584–95. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12584-12595.2002>.
- Deffieu, Maika S., and Raphael Gaudin. 2019. 'Imaging the Hepatitis B Virus: Broadcasting Live'. *Trends in Microbiology* 27 (10): 810–13. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.07.007>.
- 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'. *Journal of Virology* 71 (1): 697–704.
- Di Bisceglie, Adrian M., Paul Martin, Chris Kassianides, Mauricio Lisker-Melman, Linda Murray, Jeanne Waggoner, Zachary Goodman, Steven M. Banks, and Jay H. Hoofnagle. 1989. 'Recombinant Interferon Alfa Therapy for Chronic Hepatitis C'. *New England Journal of Medicine* 321 (22): 1506–10. <https://doi.org/10.1056/NEJM198911303212204>.
- Dodelet, V. C., and E. B. Pasquale. 2000. 'Eph Receptors and Ephrin Ligands: Embryogenesis to Tumorigenesis'. *Oncogene* 19 (49): 5614–19. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203856>.
- Dorner, Marcus, Joshua A. Horwitz, Bridget M. Donovan, Rachael N. Labitt, William C. Budell, Tamar Friling, Alexander Vogt, et al. 2013. 'Completion of the Entire Hepatitis C Virus Life Cycle in Genetically Humanized Mice'. *Nature* 501 (7466): 237–41. <https://doi.org/10.1038/nature12427>.
- Dorner, Marcus, Joshua A. Horwitz, Justin B. Robbins, Walter T. Barry, Qian Feng, Kathy Mu, Christopher T. Jones, et al. 2011. 'A Genetically Humanized Mouse Model for Hepatitis C Virus Infection'. *Nature* 474 (7350): 208–11. <https://doi.org/10.1038/nature10168>.
- Douam, Florian, Viet Loan Dao Thi, Guillemette Maurin, Judith Fresquet, Dimitri Mompelat, Mirjam B. Zeisel, Thomas F. Baumert, François-Loïc Cosset, and Dimitri Lavillette. 2014. 'Critical Interaction between E1 and E2 Glycoproteins Determines Binding and Fusion Properties of Hepatitis C Virus during Cell Entry'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (3): 776–88. <https://doi.org/10.1002/hep.26733>.
- Drummer, Heidi E., Irene Boo, and Pantelis Pountourios. 2007. 'Mutagenesis of a Conserved Fusion Peptide-like Motif and Membrane-Proximal Heptad-Repeat Region of Hepatitis C Virus Glycoprotein E1'. *The Journal of General Virology* 88 (Pt 4): 1144–48. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82567-0>.
- Dubuisson, Jean. 2007. 'Hepatitis C Virus Proteins'. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 13 (17): 2406–15. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i17.2406>.
- Dusheiko, G. 1997. 'Side Effects of Alpha Interferon in Chronic Hepatitis C'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 26 (3 Suppl 1): 112S-121S. <https://doi.org/10.1002/hep.510260720>.
- Dusheiko, Geoffrey, Janice Main, Howard Thomas, Olle Reichard, Christine Lee, Amar Dhillon, Suhra Rassam, et al. 1996. 'Ribavirin Treatment for Patients with Chronic Hepatitis C: Results of a Placebo-Controlled Study'. *Journal of Hepatology* 25 (5): 591–98. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(96\)80225-X](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(96)80225-X).

E

- 'EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016'. 2017. *Journal of Hepatology* 66 (1): 153–94. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.09.001>.

- Ebinuma, Hirotohi, Nobuhiro Nakamoto, Yun Li, David A. Price, Emma Gostick, Bruce L. Levine, J. Tobias, William W. Kwok, and Kyong-Mi Chang. 2008. 'Identification and in Vitro Expansion of Functional Antigen-Specific CD25+ FoxP3+ Regulatory T Cells in Hepatitis C Virus Infection'. *Journal of Virology* 82 (10): 5043–53. <https://doi.org/10.1128/JVI.01548-07>.
- Edwards, Victoria C., Alexander W. Tarr, Richard A. Urbanowicz, and Jonathan K. Ball. 2012. 'The Role of Neutralizing Antibodies in Hepatitis C Virus Infection'. *The Journal of General Virology* 93 (Pt 1): 1–19. <https://doi.org/10.1099/vir.0.035956-0>.
- Egger, Denise, Benno Wölk, Rainer Gosert, Leonardo Bianchi, Hubert E. Blum, Darius Moradpour, and Kurt Bienz. 2002. 'Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex'. *Journal of Virology* 76 (12): 5974–84. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.12.5974-5984.2002>.
- El Omari, Kamel, Oleg Iourin, Jan Kadlec, Geoff Sutton, Karl Harlos, Jonathan M. Grimes, and David I. Stuart. 2014. 'Unexpected Structure for the N-Terminal Domain of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1'. *Nature Communications* 5 (September): 4874. <https://doi.org/10.1038/ncomms5874>.
- Evans, Matthew J., Thomas von Hahn, Donna M. Tscherne, Andrew J. Syder, Maryline Panis, Benno Wölk, Theodora Hatzioannou, Jane A. McKeating, Paul D. Bieniasz, and Charles M. Rice. 2007. 'Claudin-1 Is a Hepatitis C Virus Co-Receptor Required for a Late Step in Entry'. *Nature* 446 (7137): 801–5. <https://doi.org/10.1038/nature05654>.
- Evans, Matthew J., Charles M. Rice, and Stephen P. Goff. 2004. 'Phosphorylation of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates Its Protein Interactions and Viral RNA Replication'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (35): 13038–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405152101>.

F

- Failla, C, L Tomei, and R De Francesco. 1994. 'Both NS3 and NS4A Are Required for Proteolytic Processing of Hepatitis C Virus Nonstructural Proteins.' *Journal of Virology* 68 (6): 3753–60.
- Farci, Patrizia, Harvey J. Alter, Doris Wong, Roger H. Miller, James W. Shih, Betsy Jett, and Robert H. Purcell. 1991. 'A Long-Term Study of Hepatitis C Virus Replication in Non-A, Non-B Hepatitis'. *New England Journal of Medicine* 325 (2): 98–104. <https://doi.org/10.1056/NEJM199107113250205>.
- Farquhar, Michelle J., Ke Hu, Helen J. Harris, Christopher Davis, Claire L. Brimacombe, Sarah J. Fletcher, Thomas F. Baumert, Joshua Z. Rappoport, Peter Balfe, and Jane A. McKeating. 2012. 'Hepatitis C Virus Induces CD81 and Claudin-1 Endocytosis'. *Journal of Virology* 86 (8): 4305–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.06996-11>.
- Fauvelle, Catherine, Daniel J. Felmlee, Emilie Crouchet, JiYoung Lee, Laura Heydmann, Mathieu Lefèvre, Andrea Magri, et al. 2016. 'Apolipoprotein E Mediates Evasion From Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies'. *Gastroenterology* 150 (1): 206-217.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.014>.
- Fehon, Richard G., Andrea I. McClatchey, and Anthony Bretscher. 2010. 'Organizing the Cell Cortex: The Role of ERM Proteins'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (4): 276–87. <https://doi.org/10.1038/nrm2866>.
- Feinstone, Stephen M., Albert Z. Kapikian, Robert H. Purcell, Harvey J. Alter, and Paul V. Holland. 1975. 'Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B'. *New England Journal of Medicine* 292 (15): 767–70. <https://doi.org/10.1056/NEJM197504102921502>.
- Fénéant, Lucie, Shoshana Levy, and Laurence Cocquerel. 2014. 'CD81 and Hepatitis C Virus (HCV) Infection'. *Viruses* 6 (2): 535–72. <https://doi.org/10.3390/v6020535>.
- Ferguson, Kathryn M. 2008. 'A Structure-Based View of Epidermal Growth Factor Receptor Regulation'. *Annual Review of Biophysics* 37: 353–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125829>.

- Ferlay, Jacques, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman, and Freddie Bray. 2015. 'Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012'. *International Journal of Cancer* 136 (5): E359-386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- Ferraris, Pauline, Elodie Beaumont, Rustem Uzbekov, Denys Brand, Julien Gaillard, Emmanuelle Blanchard, and Philippe Roingeard. 2013. 'Sequential Biogenesis of Host Cell Membrane Rearrangements Induced by Hepatitis C Virus Infection'. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 70 (7): 1297–1306. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1213-0>.
- Flajolet, M., G. Rotondo, L. Daviet, F. Bergametti, G. Inchauspé, P. Tiollais, C. Transy, and P. Legrain. 2000. 'A Genomic Approach of the Hepatitis C Virus Generates a Protein Interaction Map'. *Gene* 242 (1–2): 369–79. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00511-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00511-9).
- Fletcher, Nicola F., Garrick K. Wilson, Jacinta Murray, Ke Hu, Andrew Lewis, Gary M. Reynolds, Zania Stamataki, et al. 2012. 'Hepatitis C Virus Infects the Endothelial Cells of the Blood-Brain Barrier'. *Gastroenterology* 142 (3): 634-643.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.028>.
- Fletcher, Nicola F, Jian Ping Yang, Michelle J Farquhar, Ke Hu, Christopher Davis, Qiuchen He, Kimberly Dowd, et al. 2010. 'Hepatitis C Virus Infection of Neuroepithelioma Cell Lines'. *Gastroenterology* 139 (4): 1365–74. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.008>.
- Fofana, Isabel, Sophie E. Krieger, Fritz Grunert, Sandra Glaubien, Fei Xiao, Samira Fafi-Kremer, Eric Soulier, et al. 2010. 'Monoclonal Anti-Claudin 1 Antibodies Prevent Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes'. *Gastroenterology* 139 (3): 953-964.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.05.073>.
- Förster, Carola. 2008. 'Tight Junctions and the Modulation of Barrier Function in Disease'. *Histochemistry and Cell Biology* 130 (1): 55–70. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0424-9>.
- Foster, Toshana L., Tamara Belyaeva, Nicola J. Stonehouse, Arwen R. Pearson, and Mark Harris. 2010. 'All Three Domains of the Hepatitis C Virus Nonstructural NS5A Protein Contribute to RNA Binding'. *Journal of Virology* 84 (18): 9267–77. <https://doi.org/10.1128/JVI.00616-10>.
- Foy, Eileen, Kui Li, Rhea Sumpter, Yueh-Ming Loo, Cynthia L. Johnson, Chunfu Wang, Penny Mar Fish, et al. 2005. 'Control of Antiviral Defenses through Hepatitis C Virus Disruption of Retinoic Acid-Inducible Gene-I Signaling'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (8): 2986–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408707102>.
- Frentzen, Anne, null Anggakusuma, Engin Gürlevik, Kathrin Hueging, Sarah Knocke, Corinne Ginkel, Richard J. P. Brown, et al. 2014. 'Cell Entry, Efficient RNA Replication, and Production of Infectious Hepatitis C Virus Progeny in Mouse Liver-Derived Cells'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (1): 78–88. <https://doi.org/10.1002/hep.26626>.
- Fritzsche, Florian R., Beibei Oelrich, Manfred Johannsen, Ilka Kristiansen, Holger Moch, Klaus Jung, and Glen Kristiansen. 2008. 'Claudin-1 Protein Expression Is a Prognostic Marker of Patient Survival in Renal Cell Carcinomas'. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (21): 7035–42. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0855>.
- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1993. 'Occludin: A Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight Junctions.' *The Journal of Cell Biology* 123 (6): 1777–88. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.6.1777>.
- Furuse, M., M. Itoh, T. Hirase, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1994. 'Direct Association of Occludin with ZO-1 and Its Possible Involvement in the Localization of Occludin at Tight Junctions'. *The Journal of Cell Biology* 127 (6 Pt 1): 1617–26. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.1617>.
- Furuse, Mikio, Kohji Fujita, Takashi Hiiragi, Kazushi Fujimoto, and Shoichiro Tsukita. 1998. 'Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin'. *The Journal of Cell Biology* 141 (7): 1539–50.
- Furuse, Mikio, Masaki Hata, Kyoko Furuse, Yoko Yoshida, Akinori Haratake, Yoshinobu Sugitani, Tetsuo Noda, Akiharu Kubo, and Shoichiro Tsukita. 2002. 'Claudin-Based Tight Junctions Are Crucial for the Mammalian Epidermal Barrier: A Lesson from Claudin-1-Deficient Mice'. *The Journal of Cell Biology* 156 (6): 1099–1111. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110122>.

G

- Gale, M., C. M. Blakely, B. Kwieciszewski, S. L. Tan, M. Dossett, N. M. Tang, M. J. Korth, S. J. Polyak, D. R. Gretch, and M. G. Katze. 1998. 'Control of PKR Protein Kinase by Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein: Molecular Mechanisms of Kinase Regulation'. *Molecular and Cellular Biology* 18 (9): 5208–18. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.9.5208>.
- Gallay, Philippe A., Michael D. Bobardt, Udayan Chatterji, Daniel J. Trepanier, Daren Ure, Cosme Ordonez, and Robert Foster. 2015. 'The Novel Cyclophilin Inhibitor CPI-431-32 Concurrently Blocks HCV and HIV-1 Infections via a Similar Mechanism of Action'. *PLoS One* 10 (8): e0134707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134707>.
- Gao, De-Yong, Gen-Di Jin, Bi-Lian Yao, Dong-Hua Zhang, Lei-Lei Gu, Zhi-Meng Lu, Qiming Gong, Yu-Chun Lone, Qiang Deng, and Xin-Xin Zhang. 2010. 'Characterization of the Specific CD4+ T Cell Response against the F Protein during Chronic Hepatitis C Virus Infection'. *PLoS One* 5 (12): e14237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014237>.
- Gao, Yue, Mingguang Li, Bin Chen, Zancong Shen, Peng Guo, M. Guillaume Wientjes, and Jessie L.-S. Au. 2013. 'Predictive Models of Diffusive Nanoparticle Transport in 3-Dimensional Tumor Cell Spheroids'. *The AAPS Journal* 15 (3): 816–31. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9478-2>.
- Garaigorta, Urtzi, and Francis V. Chisari. 2009. 'Hepatitis C Virus Blocks Interferon Effector Function by Inducing Protein Kinase R Phosphorylation'. *Cell Host & Microbe* 6 (6): 513–22. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.11.004>.
- Gastaminza, Pablo, Guofeng Cheng, Stefan Wieland, Jin Zhong, Wei Liao, and Francis V. Chisari. 2008. 'Cellular Determinants of Hepatitis C Virus Assembly, Maturation, Degradation, and Secretion'. *Journal of Virology* 82 (5): 2120–29. <https://doi.org/10.1128/JVI.02053-07>.
- Gentzsch, Juliane, Christiane Brohm, Eike Steinmann, Martina Friesland, Nicolas Menzel, Gabrielle Vieyres, Paula Monteiro Perin, Anne Frentzen, Lars Kaderali, and Thomas Pietschmann. 2013. 'Hepatitis c Virus P7 Is Critical for Capsid Assembly and Envelopment'. *PLoS Pathogens* 9 (5): e1003355. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003355>.
- Gerold, Gisa, Felix Meissner, Janina Bruening, Kathrin Welsch, Paula M. Perin, Thomas F. Baumert, Florian W. Vondran, et al. 2015. 'Quantitative Proteomics Identifies Serum Response Factor Binding Protein 1 as a Host Factor for Hepatitis C Virus Entry'. *Cell Reports* 12 (5): 864–78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.063>.
- Getchell, Jane P., Kelly E. Wroblewski, Alfred DeMaria, Jr, Christine L. Bean, Monica M. Parker, Mark Pandori, et al. 2013. 'Testing for HCV Infection: An Update of Guidance for Clinicians and Laboratorians'. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 62 (18): 362.
- Ghany, Marc G., Doris B. Strader, David L. Thomas, and Leonard B. Seeff. 2009. 'Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C: An Update'. *Hepatology* 49 (4): 1335–74. <https://doi.org/10.1002/hep.22759>.
- Gibson, Toby J., Markus Seiler, and Reiner A. Veitia. 2013. 'The Transience of Transient Overexpression'. *Nature Methods* 10 (8): 715–21. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2534>.
- Go, Gwang-woong, and Arya Mani. 2012. 'Low-Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Family Orchestrates Cholesterol Homeostasis'. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 85 (1): 19–28.
- Goffard, Anne, Nathalie Callens, Birke Bartosch, Czeslaw Wychowski, François-Loïc Cosset, Claire Montpellier, and Jean Dubuisson. 2005. 'Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins'. *Journal of Virology* 79 (13): 8400–8409. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8400-8409.2005>.
- Goffard, Anne, and Jean Dubuisson. 2003. 'Glycosylation of Hepatitis C Virus Envelope Proteins'. *Biochimie* 85 (3–4): 295–301. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(03\)00004-x](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(03)00004-x).
- Golden-Mason, Lucy, Brent Palmer, Jared Klarquist, John A. Mengshol, Nicole Castelblanco, and Hugo R. Rosen. 2007. 'Upregulation of PD-1 Expression on Circulating and Intrahepatic

- Hepatitis C Virus-Specific CD8⁺ T Cells Associated with Reversible Immune Dysfunction'. *Journal of Virology* 81 (17): 9249–58. <https://doi.org/10.1128/JVI.00409-07>.
- Goldman, J. P., M. P. Blundell, L. Lopes, C. Kinnon, J. P. Di Santo, and A. J. Thrasher. 1998. 'Enhanced Human Cell Engraftment in Mice Deficient in RAG2 and the Common Cytokine Receptor Gamma Chain'. *British Journal of Haematology* 103 (2): 335–42. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00980.x>.
- Goldstein, J. L., and M. S. Brown. 1974. 'Binding and Degradation of Low Density Lipoproteins by Cultured Human Fibroblasts. Comparison of Cells from a Normal Subject and from a Patient with Homozygous Familial Hypercholesterolemia'. *The Journal of Biological Chemistry* 249 (16): 5153–62.
- González-Almela, Esther, Hugh Williams, Miguel A. Sanz, and Luis Carrasco. 2018. 'The Initiation Factors EIF2, EIF2A, EIF2D, EIF4A, and EIF4G Are Not Involved in Translation Driven by Hepatitis C Virus IRES in Human Cells'. *Frontiers in Microbiology* 9: 207. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00207>.
- Goossens, Nicolas, and Yujin Hoshida. 2015. 'Hepatitis C Virus-Induced Hepatocellular Carcinoma'. *Clinical and Molecular Hepatology* 21 (2): 105–14. <https://doi.org/10.3350/cmh.2015.21.2.105>.
- Gosert, Rainer, Denise Egger, Volker Lohmann, Ralf Bartenschlager, Hubert E. Blum, Kurt Bienz, and Darius Moradpour. 2003. 'Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons'. *Journal of Virology* 77 (9): 5487–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.9.5487-5492.2003>.
- Goutagny, Nadège, Ahmed Fatmi, Victor De Ledinghen, François Penin, Patrice Couzigou, Geneviève Inchauspé, and Christine Bain. 2003. 'Evidence of Viral Replication in Circulating Dendritic Cells during Hepatitis C Virus Infection'. *The Journal of Infectious Diseases* 187 (12): 1951–58. <https://doi.org/10.1086/375350>.
- Gouttenoire, Jérôme, Roland Montserret, Audrey Kennel, François Penin, and Darius Moradpour. 2009. 'An Amphipathic Alpha-Helix at the C Terminus of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Mediates Membrane Association'. *Journal of Virology* 83 (21): 11378–84. <https://doi.org/10.1128/JVI.01122-09>.
- Gouttenoire, Jérôme, Philippe Roingeard, François Penin, and Darius Moradpour. 2010. 'Amphipathic Alpha-Helix AH2 Is a Major Determinant for the Oligomerization of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B'. *Journal of Virology* 84 (24): 12529–37. <https://doi.org/10.1128/JVI.01798-10>.
- Grakoui, A., D. W. McCourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1993. 'A Second Hepatitis C Virus-Encoded Proteinase'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (22): 10583–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10583>.
- Grakoui, Arash, Naglaa H. Shoukry, David J. Woollard, Jin-Hwan Han, Holly L. Hanson, John Ghayeb, Krishna K. Murthy, Charles M. Rice, and Christopher M. Walker. 2003. 'HCV Persistence and Immune Evasion in the Absence of Memory T Cell Help'. *Science (New York, N.Y.)* 302 (5645): 659–62. <https://doi.org/10.1126/science.1088774>.
- Grebely, Jason, Kimberly Page, Rachel Sacks-Davis, Maarten Schim van der Loeff, Thomas M. Rice, Julie Bruneau, Meghan D. Morris, et al. 2014. 'The Effects of Female Sex, Viral Genotype, and IL28B Genotype on Spontaneous Clearance of Acute Hepatitis C Virus Infection'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (1): 109–20. <https://doi.org/10.1002/hep.26639>.
- Griffin, Stephen, Corine Stgelais, Ania M. Owsianka, Arvind H. Patel, David Rowlands, and Mark Harris. 2008. 'Genotype-Dependent Sensitivity of Hepatitis C Virus to Inhibitors of the P7 Ion Channel'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48 (6): 1779–90. <https://doi.org/10.1002/hep.22555>.
- Grompe, M., M. al-Dhalimy, M. Finegold, C. N. Ou, T. Burlingame, N. G. Kennaway, and P. Soriano. 1993. 'Loss of Fumarylacetoacetate Hydrolase Is Responsible for the Neonatal Hepatic Dysfunction Phenotype of Lethal Albino Mice'. *Genes & Development* 7 (12A): 2298–2307. <https://doi.org/10.1101/gad.7.12a.2298>.
- Grompe, M., S. Lindstedt, M. al-Dhalimy, N. G. Kennaway, J. Papaconstantinou, C. A. Torres-Ramos, C. N. Ou, and M. Finegold. 1995. 'Pharmacological Correction of Neonatal Lethal Hepatic

- Dysfunction in a Murine Model of Hereditary Tyrosinaemia Type I'. *Nature Genetics* 10 (4): 453–60. <https://doi.org/10.1038/ng0895-453>.
- Grove, Joe, and Mark Marsh. 2011. 'The Cell Biology of Receptor-Mediated Virus Entry'. *The Journal of Cell Biology* 195 (7): 1071–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108131>.

H

- Hagen, Susan J. 2017. 'Non-Canonical Functions of Claudin Proteins: Beyond the Regulation of Cell-Cell Adhesions'. *Tissue Barriers* 5 (2): e1327839. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1327839>.
- Hahn, B., Y. K. Kim, J. H. Kim, T. Y. Kim, and S. K. Jang. 1998. 'Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein L Interacts with the 3' Border of the Internal Ribosomal Entry Site of Hepatitis C Virus'. *Journal of Virology* 72 (11): 8782–88.
- Hahn, Thomas von, Joo Chun Yoon, Harvey Alter, Charles M. Rice, Barbara Rehermann, Peter Balfe, and Jane A. McKeating. 2007. 'Hepatitis C Virus Continuously Escapes from Neutralizing Antibody and T-Cell Responses during Chronic Infection in Vivo'. *Gastroenterology* 132 (2): 667–78. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.12.008>.
- Haid, Sibylle, Thomas Pietschmann, and Eve-Isabelle Pécheur. 2009. 'Low PH-Dependent Hepatitis C Virus Membrane Fusion Depends on E2 Integrity, Target Lipid Composition, and Density of Virus Particles'. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (26): 17657–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014647>.
- Han, J. H., V. Shyamala, K. H. Richman, M. J. Brauer, B. Irvine, M. S. Urdea, P. Tekamp-Olson, G. Kuo, Q. L. Choo, and M. Houghton. 1991. 'Characterization of the Terminal Regions of Hepatitis C Viral RNA: Identification of Conserved Sequences in the 5' Untranslated Region and Poly(A) Tails at the 3' End'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (5): 1711–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1711>.
- Hanoulle, Xavier, Aurélie Badillo, Jean-Michel Wieruszkeski, Dries Verdegem, Isabelle Landrieu, Ralf Bartenschlager, François Penin, and Guy Lippens. 2009. 'Hepatitis C Virus NS5A Protein Is a Substrate for the Peptidyl-Prolyl Cis/Trans Isomerase Activity of Cyclophilins A and B'. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (20): 13589–601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809244200>.
- Harris, Helen J., Christopher Davis, Jonathan G. L. Mullins, Ke Hu, Margaret Goodall, Michelle J. Farquhar, Christopher J. Mee, et al. 2010. 'Claudin Association with CD81 Defines Hepatitis C Virus Entry'. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (27): 21092–102. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.104836>.
- Harris, Helen J., Michelle J. Farquhar, Christopher J. Mee, Christopher Davis, Gary M. Reynolds, Adam Jennings, Ke Hu, et al. 2008. 'CD81 and Claudin 1 Coreceptor Association: Role in Hepatitis C Virus Entry'. *Journal of Virology* 82 (10): 5007–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02286-07>.
- Harrus, Déborah, Neveen Ahmed-El-Sayed, Philip C. Simister, Steve Miller, Martine Triconnet, Curt H. Hagedorn, Kathleen Mahias, Félix A. Rey, Thérèse Astier-Gin, and Stéphane Bressanelli. 2010. 'Further Insights into the Roles of GTP and the C Terminus of the Hepatitis C Virus Polymerase in the Initiation of RNA Synthesis'. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (43): 32906–18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.151316>.
- He, L. F., D. Alling, T. Popkin, M. Shapiro, H. J. Alter, and R. H. Purcell. 1987. 'Determining the Size of Non-A, Non-B Hepatitis Virus by Filtration'. *The Journal of Infectious Diseases* 156 (4): 636–40. <https://doi.org/10.1093/infdis/156.4.636>.
- Heckel, J. L., E. P. Sandgren, J. L. Degen, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster. 1990. 'Neonatal Bleeding in Transgenic Mice Expressing Urokinase-Type Plasminogen Activator'. *Cell* 62 (3): 447–56. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90010-c](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90010-c).

- Hecker, C., C. Weise, J. Schneider-Schaulies, H. C. Holmes, and V. ter Meulen. 1997. 'Specific Binding of HIV-1 Envelope Protein Gp120 to the Structural Membrane Proteins Ezrin and Moesin'. *Virus Research* 49 (2): 215–23. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(97\)00039-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(97)00039-7).
- Henke, Jura Inga, Dagmar Goergen, Junfeng Zheng, Yutong Song, Christian G. Schüttler, Carmen Fehr, Christiane Jünemann, and Michael Niepmann. 2008. 'MicroRNA-122 Stimulates Translation of Hepatitis C Virus RNA'. *The EMBO Journal* 27 (24): 3300–3310. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.244>.
- Herker, Eva, Charles Harris, Céline Hernandez, Arnaud Carpentier, Katrin Kaehlcke, Arielle R. Rosenberg, Robert V. Farese, and Melanie Ott. 2010. 'Efficient Hepatitis C Virus Particle Formation Requires Diacylglycerol Acyltransferase-1'. *Nature Medicine* 16 (11): 1295–98. <https://doi.org/10.1038/nm.2238>.
- Hiet, Marie-Sophie, Oliver Bauhofer, Margarita Zayas, Hanna Roth, Yasuhito Tanaka, Peter Schirmacher, Joschka Willemsen, et al. 2015. 'Control of Temporal Activation of Hepatitis C Virus-Induced Interferon Response by Domain 2 of Nonstructural Protein 5A'. *Journal of Hepatology* 63 (4): 829–37. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.04.015>.
- Hijikata, M., Y. K. Shimizu, H. Kato, A. Iwamoto, J. W. Shih, H. J. Alter, R. H. Purcell, and H. Yoshikura. 1993. 'Equilibrium Centrifugation Studies of Hepatitis C Virus: Evidence for Circulating Immune Complexes'. *Journal of Virology* 67 (4): 1953–58.
- Hirai, H., Y. Maru, K. Hagiwara, J. Nishida, and F. Takaku. 1987. 'A Novel Putative Tyrosine Kinase Receptor Encoded by the Eph Gene'. *Science (New York, N.Y.)* 238 (4834): 1717–20. <https://doi.org/10.1126/science.2825356>.
- Honda, M., L. H. Ping, R. C. Rijnbrand, E. Amphlett, B. Clarke, D. Rowlands, and S. M. Lemon. 1996. 'Structural Requirements for Initiation of Translation by Internal Ribosome Entry within Genome-Length Hepatitis C Virus RNA'. *Virology* 222 (1): 31–42. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0395>.
- Hoofnagle, J. H. 1997. 'Hepatitis C: The Clinical Spectrum of Disease'. *Hepatology* 26 (S3): 15S-20S. <https://doi.org/10.1002/hep.510260703>.
- Hoofnagle, Jay H., Kevin D. Mullen, D. Brian Jones, Vinod Rustgi, Adrian Di Bisceglie, Marion Peters, Jeanne G. Waggoner, Yoon Park, and E. Anthony Jones. 1986. 'Treatment of Chronic Non-A, Non-B Hepatitis with Recombinant Human Alpha Interferon'. *New England Journal of Medicine* 315 (25): 1575–78. <https://doi.org/10.1056/NEJM198612183152503>.
- Horner, Stacy M., and Michael Gale. 2013. 'Regulation of Hepatic Innate Immunity by Hepatitis C Virus'. *Nature Medicine* 19 (7): 879–88. <https://doi.org/10.1038/nm.3253>.
- Horner, Stacy M., Helene Minyi Liu, Hae Soo Park, Jessica Briley, and Michael Gale. 2011. 'Mitochondrial-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes (MAM) Form Innate Immune Synapses and Are Targeted by Hepatitis C Virus'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (35): 14590–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110133108>.
- Hornung, Veit, Jana Ellegast, Sarah Kim, Krzysztof Brzózka, Andreas Jung, Hiroki Kato, Hendrik Poeck, et al. 2006. '5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I'. *Science (New York, N.Y.)* 314 (5801): 994–97. <https://doi.org/10.1126/science.1132505>.
- Horsley-Silva, Jennifer L., and Hugo E. Vargas. 2017. 'New Therapies for Hepatitis C Virus Infection'. *Gastroenterology & Hepatology* 13 (1): 22–31.
- Hou, Jianghui, David L. Paul, and Daniel A. Goodenough. 2005. 'Paracellin-1 and the Modulation of Ion Selectivity of Tight Junctions'. *Journal of Cell Science* 118 (Pt 21): 5109–18. <https://doi.org/10.1242/jcs.02631>.
- Hsu, Mayla, Jie Zhang, Mike Flint, Carine Logvinoff, Cecilia Cheng-Mayer, Charles M. Rice, and Jane A. McKeating. 2003. 'Hepatitis C Virus Glycoproteins Mediate PH-Dependent Cell Entry of Pseudotyped Retroviral Particles'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (12): 7271–76. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832180100>.
- Hügler, T., F. Fehrmann, E. Bieck, M. Kohara, H. G. Kräusslich, 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. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0873>.

I

- Ishii, Koji, Kyoko Murakami, Su Su Hmwe, Bin Zhang, Jin Li, Masayuki Shirakura, Kenichi Morikawa, et al. 2008. 'Trans-Encapsidation of Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon RNA with Viral Structure Proteins'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371 (3): 446–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.110>.
- Ito, T., S. M. Tahara, and M. M. Lai. 1998. 'The 3'-Untranslated Region of Hepatitis C Virus RNA Enhances Translation from an Internal Ribosomal Entry Site'. *Journal of Virology* 72 (11): 8789–96.
- Itoh, M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou, and S. Tsukita. 1999. 'Direct Binding of Three Tight Junction-Associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH Termini of Claudins'. *The Journal of Cell Biology* 147 (6): 1351–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.6.1351>.

J

- Jaafar, Zane A., Akihiro Oguro, Yoshikazu Nakamura, and Jeffrey S. Kieft. 2016. 'Translation Initiation by the Hepatitis C Virus IRES Requires EIF1A and Ribosomal Complex Remodeling'. *ELife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.21198>.
- Jacobson, Ira M., John G. McHutchison, Geoffrey Dusheiko, Adrian M. Di Bisceglie, K. Rajender Reddy, Natalie H. Bzowej, Patrick Marcellin, et al. 2011. 'Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection'. *The New England Journal of Medicine* 364 (25): 2405–16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1012912>.
- Jammart, Baptiste, Maud Michelet, Eve-Isabelle Pécheur, Romain Parent, Birke Bartosch, Fabien Zoulim, and David Durantel. 2013. 'Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL)-Producing and Hepatitis C Virus-Replicating HepG2 Cells Secrete No More Lipoviroparticles than VLDL-Deficient Huh7.5 Cells'. *Journal of Virology* 87 (9): 5065–80. <https://doi.org/10.1128/JVI.01405-12>.
- Jirasko, Vlastimil, Roland Montserret, Nicole Appel, Anne Janvier, Leah Eustachi, Christiane Brohm, Eike Steinmann, Thomas Pietschmann, Francois Penin, and Ralf Bartenschlager. 2008. 'Structural and Functional Characterization of Nonstructural Protein 2 for Its Role in Hepatitis C Virus Assembly'. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (42): 28546–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803981200>.
- Jirasko, Vlastimil, Roland Montserret, Ji Young Lee, Jérôme Gouttenoire, Darius Moradpour, Francois Penin, and Ralf 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001233>.
- Jo, Juandy, Ulrike Aichele, Nadine Kersting, Rahel Klein, Peter Aichele, Emmanuel Bisse, Andrew K. Sewell, et al. 2009. 'Analysis of CD8+ T-Cell-Mediated Inhibition of Hepatitis C Virus Replication Using a Novel Immunological Model'. *Gastroenterology* 136 (4): 1391–1401. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.034>.
- Jo, Juandy, Bertram Bengsch, Bianca Seigel, Sibylle J. Rau, Julia Schmidt, Emmanuel Bisse, Peter Aichele, et al. 2012. 'Low Perforin Expression of Early Differentiated HCV-Specific CD8+ T Cells Limits Their Hepatotoxic Potential'. *Journal of Hepatology* 57 (1): 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.030>.
- Jones, Christopher T., Catherine L. Murray, Dawnnica K. Eastman, Jodie Tassello, and Charles M. Rice. 2007. 'Hepatitis C Virus P7 and NS2 Proteins Are Essential for Production of Infectious Virus'. *Journal of Virology* 81 (16): 8374–83. <https://doi.org/10.1128/JVI.00690-07>.

Jopling, Catherine L., Minkyung Yi, Alissa M. Lancaster, Stanley M. Lemon, and Peter Sarnow. 2005. 'Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA'. *Science (New York, N.Y.)* 309 (5740): 1577–81. <https://doi.org/10.1126/science.1113329>.

K

- Kamar, N., O. Marion, L. Rostaing, O. Cointault, D. Ribes, L. Lavayssière, L. Esposito, et al. 2016. 'Efficacy and Safety of Sofosbuvir-Based Antiviral Therapy to Treat Hepatitis C Virus Infection After Kidney Transplantation'. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 16 (5): 1474–79. <https://doi.org/10.1111/ajt.13518>.
- Kanto, T., N. Hayashi, T. Takehara, H. Hagiwara, E. Mita, M. Naito, A. Kasahara, H. Fusamoto, and T. Kamada. 1995. 'Density Analysis of Hepatitis C Virus Particle Population in the Circulation of Infected Hosts: Implications for Virus Neutralization or Persistence'. *Journal of Hepatology* 22 (4): 440–48. [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(95\)80107-3](https://doi.org/10.1016/0168-8278(95)80107-3).
- Kapadia, Sharookh B., Heidi Barth, Thomas Baumert, Jane A. McKeating, and Francis V. Chisari. 2007. 'Initiation of Hepatitis C Virus Infection Is Dependent on Cholesterol and Cooperativity between CD81 and Scavenger Receptor B Type I'. *Journal of Virology* 81 (1): 374–83. <https://doi.org/10.1128/JVI.01134-06>.
- Kapadia, Sharookh B., and Francis V. Chisari. 2005. 'Hepatitis C Virus RNA Replication Is Regulated by Host Geranylgeranylation and Fatty Acids'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (7): 2561–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409834102>.
- Kared, Hassen, Thomas Fabre, Nathalie Bédard, Julie Bruneau, and Naglaa H. Shoukry. 2013. 'Galectin-9 and IL-21 Mediate Cross-Regulation between Th17 and Treg Cells during Acute Hepatitis C'. *PLoS Pathogens* 9 (6): e1003422. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003422>.
- Kato, Jun, Naoya Kato, Hideo Yoshida, Suzane Kioko Ono-Nita, Yasushi Shiratori, and Masao Omata. 2002. 'Hepatitis C Virus NS4A and NS4B Proteins Suppress Translation in Vivo'. *Journal of Medical Virology* 66 (2): 187–99. <https://doi.org/10.1002/jmv.2129>.
- Kato, N., H. Sekiya, Y. Ootsuyama, T. Nakazawa, M. Hijikata, S. Ohkoshi, and K. Shimotohno. 1993. 'Humoral Immune Response to Hypervariable Region 1 of the Putative Envelope Glycoprotein (Gp70) of Hepatitis C Virus'. *Journal of Virology* 67 (7): 3923–30.
- Kato, Takanobu, Tomoko Date, Michiko Miyamoto, Akihiro Furusaka, Katsutoshi Tokushige, Masashi Mizokami, and Takaji Wakita. 2003. 'Efficient Replication of the Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon'. *Gastroenterology* 125 (6): 1808–17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.09.023>.
- Kato, Takanobu, Akihiro Furusaka, Michiko Miyamoto, Tomoko Date, Kotaro Yasui, Jun Hiramoto, Kazuo Nagayama, Teruji Tanaka, and Takaji Wakita. 2001. 'Sequence Analysis of Hepatitis C Virus Isolated from a Fulminant Hepatitis Patient*'. *Journal of Medical Virology* 64 (3): 334–39. <https://doi.org/10.1002/jmv.1055>.
- Kaul, Artur, Sarah Stauffer, Carola Berger, Thomas Pertel, Jennifer Schmitt, Stephanie Kallis, Margarita Zayas, et al. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000546>.
- Kiiver, Kaja, Andres Merits, Mart Ustav, and Eva Zusinaite. 2006. 'Complex Formation between Hepatitis C Virus NS2 and NS3 Proteins'. *Virus Research* 117 (2): 264–72. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.10.021>.
- Kim, Jong Heon, Ki Young Paek, Sang Hoon Ha, Sungchan Cho, Kobong Choi, Chon Saeng Kim, Sung Ho Ryu, and Sung Key Jang. 2004. 'A Cellular RNA-Binding Protein Enhances Internal Ribosomal Entry Site-Dependent Translation through an Interaction Downstream of the Hepatitis C Virus Polyprotein Initiation Codon'. *Molecular and Cellular Biology* 24 (18): 7878–90. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.7878-7890.2004>.

- Kitadokoro, K., D. Bordo, G. Galli, R. Petracca, F. Falugi, S. Abrignani, G. Grandi, and M. Bolognesi. 2001. 'CD81 Extracellular Domain 3D Structure: Insight into the Tetraspanin Superfamily Structural Motifs'. *The EMBO Journal* 20 (1–2): 12–18. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.12>.
- Klenerman, Paul, and Robert Thimme. 2012. 'T Cell Responses in Hepatitis C: The Good, the Bad and the Unconventional'. *Gut* 61 (8): 1226–34. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300620>.
- Knodell, R. G., M. E. Conrad, J. L. Dienstag, and C. J. Bell. 1975. 'Etiological Spectrum of Post-Transfusion Hepatitis'. *Gastroenterology* 69 (6): 1278–85.
- Koev, Gennadiy, Roger F. Duncan, and Michael M. C. Lai. 2002. 'Hepatitis C Virus IRES-Dependent Translation Is Insensitive to an EIF2alpha-Independent Mechanism of Inhibition by Interferon in Hepatocyte Cell Lines'. *Virology* 297 (2): 195–202. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1455>.
- Kohaar, Indu, Alexander Ploss, Evgenia Korol, Kathy Mu, John W. Schoggins, Thomas R. O'Brien, Charles M. Rice, and Ludmila Prokunina-Olsson. 2010. 'Splicing Diversity of the Human OCLN Gene and Its Biological Significance for Hepatitis C Virus Entry'. *Journal of Virology* 84 (14): 6987–94. <https://doi.org/10.1128/JVI.00196-10>.
- 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'. *Journal of Virology* 70 (6): 3363–71.
- Koutsoudakis, George, Artur Kaul, Eike Steinmann, Stephanie Kallis, Volker Lohmann, Thomas Pietschmann, and Ralf Bartenschlager. 2006. 'Characterization of the Early Steps of Hepatitis C Virus Infection by Using Luciferase Reporter Viruses'. *Journal of Virology* 80 (11): 5308–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02460-05>.
- Krieger, M. 2001. 'Scavenger Receptor Class B Type I Is a Multiligand HDL Receptor That Influences Diverse Physiologic Systems'. *The Journal of Clinical Investigation* 108 (6): 793–97. <https://doi.org/10.1172/JCI14011>.
- Krieger, Sophie E., Mirjam B. Zeisel, Christopher Davis, Christine Thumann, Helen J. Harris, Eva K. Schnober, Christopher Mee, et al. 2010. 'Inhibition of Hepatitis C Virus Infection by Anti-Claudin-1 Antibodies Is Mediated by Neutralization of E2-CD81-Claudin-1 Associations'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (4): 1144–57. <https://doi.org/10.1002/hep.23445>.
- Kumar, Anoop, Manoj Kumar Rajput, Deepika Paliwal, Aakanksha Yadav, Reba Chhabra, and Surinder Singh. 2018. 'Genotyping & Diagnostic Methods for Hepatitis C Virus: A Need of Low-Resource Countries'. *The Indian Journal of Medical Research* 147 (5): 445. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1850_16.
- Kuo, G., Q. L. Choo, H. J. Alter, G. L. Gitnick, A. G. Redeker, R. H. Purcell, T. Miyamura, J. L. Dienstag, M. J. Alter, and C. E. Stevens. 1989. 'An Assay for Circulating Antibodies to a Major Etiologic Virus of Human Non-A, Non-B Hepatitis'. *Science (New York, N.Y.)* 244 (4902): 362–64. <https://doi.org/10.1126/science.2496467>.
- Kurosaki, M., N. Enomoto, F. Marumo, and C. Sato. 1993. 'Rapid Sequence Variation of the Hypervariable Region of Hepatitis C Virus during the Course of Chronic Infection'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 18 (6): 1293–99.

L

- Laar, Thijis van de, Oliver Pybus, Sylvia Bruisten, David Brown, Mark Nelson, Sanjay Bhagani, Martin Vogel, et al. 2009. 'Evidence of a Large, International Network of HCV Transmission in HIV-Positive Men Who Have Sex with Men'. *Gastroenterology* 136 (5): 1609–17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.006>.
- Lacek, Krzysztof, Koen Vercauteren, Katarzyna Grzyb, Mariarosaria Naddeo, Lieven Verhoye, Marek Patryk Słowikowski, Samira Fafi-Kremer, et al. 2012. 'Novel Human SR-BI Antibodies Prevent Infection and Dissemination of HCV in Vitro and in Humanized Mice'. *Journal of Hepatology* 57 (1): 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.018>.
- Lanford, R. E., C. Bigger, S. Bassett, and G. Klimpel. 2001. 'The Chimpanzee Model of Hepatitis C Virus Infections'. *ILAR Journal* 42 (2): 117–26. <https://doi.org/10.1093/ilar.42.2.117>.

- Lavie, Muriel, Lydia Linna, Rehab I. Moustafa, Sandrine Belouzard, Masayoshi Fukasawa, and Jean Dubuisson. 2019. 'Role of the Cytosolic Domain of Occludin in Trafficking and Hepatitis C Virus Infection'. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, July. <https://doi.org/10.1111/tra.12680>.
- Lavie, Muriel, Xavier Hanouille, and Jean Dubuisson. 2018. 'Glycan Shielding and Modulation of Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies'. *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00910>.
- Lavillette, Dimitri, Eve-Isabelle Pécheur, Peggy Donot, Judith Fresquet, Jennifer Molle, Romuald Corbau, Marlène Dreux, François Penin, and François-Loïc Cosset. 2007. 'Characterization of Fusion Determinants Points to the Involvement of Three Discrete Regions of Both E1 and E2 Glycoproteins in the Membrane Fusion Process of Hepatitis C Virus'. *Journal of Virology* 81 (16): 8752–65. <https://doi.org/10.1128/JVI.02642-06>.
- Lechner, F., D. K. Wong, P. R. Dunbar, R. Chapman, R. T. Chung, P. Dohrenwend, G. Robbins, R. Phillips, P. Klenerman, and B. D. Walker. 2000. 'Analysis of Successful Immune Responses in Persons Infected with Hepatitis C Virus'. *The Journal of Experimental Medicine* 191 (9): 1499–1512. <https://doi.org/10.1084/jem.191.9.1499>.
- Lee, Stephen R., Keith W. Kardos, Eugene Schiff, Cheryl A. Berne, Karam Mounzer, Alpha T. Banks, Harvey A. Tatum, et al. 2011. 'Evaluation of a New, Rapid Test for Detecting HCV Infection, Suitable for Use with Blood or Oral Fluid'. *Journal of Virological Methods* 172 (1): 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.12.009>.
- Leruez-Ville, M., J. M. Kunstmann, M. De Almeida, C. Rouzioux, and M. L. Chaix. 2000. 'Detection of Hepatitis C Virus in the Semen of Infected Men'. *Lancet (London, England)* 356 (9223): 42–43. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02435-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02435-1).
- Levi-Montalcini, R., and S. Cohen. 1960. 'Effects of the Extract of the Mouse Submaxillary Salivary Glands on the Sympathetic System of Mammals'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 85 (March): 324–41. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb49963.x>.
- Levy, S., V. Q. Nguyen, M. L. Andria, and S. Takahashi. 1991. 'Structure and Membrane Topology of TAPA-1'. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (22): 14597–602.
- Li, Hsiao-Fen, Chia-Hsuan Huang, Li-Shuang Ai, Chin-Kai Chuang, and Steve S. L. Chen. 2009. 'Mutagenesis of the Fusion Peptide-like Domain of Hepatitis C Virus E1 Glycoprotein: Involvement in Cell Fusion and Virus Entry'. *Journal of Biomedical Science* 16 (September): 89. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-89>.
- Li, Kui, Eileen Foy, Josephine C. Ferreon, Mitsuyasu Nakamura, Allan C. M. Ferreon, Masanori Ikeda, Stuart C. Ray, Michael Gale, and Stanley M. Lemon. 2005. 'Immune Evasion by Hepatitis C Virus NS3/4A Protease-Mediated Cleavage of the Toll-like Receptor 3 Adaptor Protein TRIF'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (8): 2992–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408824102>.
- Li, Kui, Nan L. Li, Dahai Wei, Susan R. Pfeffer, Meiyun Fan, and Lawrence M. Pfeffer. 2012. 'Activation of Chemokine and Inflammatory Cytokine Response in Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes Depends on Toll-like Receptor 3 Sensing of Hepatitis C Virus Double-Stranded RNA Intermediates'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (3): 666–75. <https://doi.org/10.1002/hep.24763>.
- Li, Qisheng, Catherine Sodroski, Brianna Lowey, Cameron J. Schweitzer, Helen Cha, Fang Zhang, and T. Jake Liang. 2016. 'Hepatitis C Virus Depends on E-Cadherin as an Entry Factor and Regulates Its Expression in Epithelial-to-Mesenchymal Transition'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (27): 7620–25. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602701113>.
- Li, Xiao-Dong, Lijun Sun, Rashu B. Seth, Gabriel Pineda, and Zhijian J. Chen. 2005. 'Hepatitis C Virus Protease NS3/4A Cleaves Mitochondrial Antiviral Signaling Protein off the Mitochondria to Evade Innate Immunity'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (49): 17717–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508531102>.
- Li, You, Takahiro Masaki, Daisuke Yamane, David R. McGivern, and Stanley M. Lemon. 2013. 'Competing and Noncompeting Activities of MiR-122 and the 5' Exonuclease Xrn1 in Regulation of Hepatitis C Virus Replication'. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America* 110 (5): 1881–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213515110>.
- Li, Yuanhe, Alan S. Fanning, James M. Anderson, and Arnon Lavie. 2005. ‘Structure of the Conserved Cytoplasmic C-Terminal Domain of Occludin: Identification of the ZO-1 Binding Surface’. *Journal of Molecular Biology* 352 (1): 151–64. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.017>.
- Lin, C., A. D. Kwong, and R. B. Perni. 2006. ‘Discovery and Development of VX-950, a Novel, Covalent, and Reversible Inhibitor of Hepatitis C Virus NS3.4A Serine Protease’. *Infectious Disorders Drug Targets* 6 (1): 3–16.
- Lin, C., B. D. Lindenbach, B. M. Prágai, 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’. *Journal of Virology* 68 (8): 5063–73.
- Lin, C, J A Thomson, and C M Rice. 1995. ‘A Central Region in the Hepatitis C Virus NS4A Protein Allows Formation of an Active NS3-NS4A Serine Proteinase Complex in Vivo and in Vitro.’ *Journal of Virology* 69 (7): 4373–80.
- Lin, H. H., J. H. Kao, H. Y. Hsu, Y. H. Ni, M. H. Chang, S. C. Huang, L. H. Hwang, P. J. Chen, and D. S. Chen. 1995. ‘Absence of Infection in Breast-Fed Infants Born to Hepatitis C Virus-Infected Mothers’. *The Journal of Pediatrics* 126 (4): 589–91. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(95\)70356-x](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(95)70356-x).
- Lin, Wenyu, Won Hyeok Choe, Yoichi Hiasa, Yoshitaka Kamegaya, Jason T. Blackard, Emmett V. Schmidt, and Raymond T. Chung. 2005. ‘Hepatitis C Virus Expression Suppresses Interferon Signaling by Degrading STAT1’. *Gastroenterology* 128 (4): 1034–41. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.006>.
- Lindberg, R A, and T Hunter. 1990. ‘cDNA Cloning and Characterization of Eck, an Epithelial Cell Receptor Protein-Tyrosine Kinase in the Eph/Elk Family of Protein Kinases.’ *Molecular and Cellular Biology* 10 (12): 6316–24.
- Lindenbach, Brett D., Matthew J. Evans, Andrew J. Syder, Benno Wölk, Timothy L. Tellinghuisen, Christopher C. Liu, Toshiaki Maruyama, et al. 2005. ‘Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture’. *Science (New York, N.Y.)* 309 (5734): 623–26. <https://doi.org/10.1126/science.1114016>.
- Lindenbach, Brett D., Philip Meuleman, Alexander Ploss, Thomas Vanwolleghem, Andrew J. Syder, Jane A. McKeating, Robert E. Lanford, et al. 2006. ‘Cell Culture-Grown Hepatitis C Virus Is Infectious in Vivo and Can Be Recultured in Vitro’. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (10): 3805–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511218103>.
- Liu, Shufeng, Wayne Kuo, Wei Yang, Weiqun Liu, Gregory A. Gibson, Kenneth Dorko, Simon C. Watkins, Stephen C. Strom, and Tianyi Wang. 2010. ‘The Second Extracellular Loop Dictates Occludin-Mediated HCV Entry’. *Virology* 407 (1): 160–70. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.009>.
- Liu, Zhe, Feng Yang, Jason M. Robotham, and Hengli Tang. 2009. ‘Critical Role of Cyclophilin A and Its Prolyl-Peptidyl Isomerase Activity in the Structure and Function of the Hepatitis C Virus Replication Complex’. *Journal of Virology* 83 (13): 6554–65. <https://doi.org/10.1128/JVI.02550-08>.
- Logvinoff, C., M. E. Major, D. Oldach, S. Heyward, A. Talal, P. Balfe, S. M. Feinstone, H. Alter, C. M. Rice, and J. A. McKeating. 2004. ‘Neutralizing Antibody Response during Acute and Chronic Hepatitis C Virus Infection’. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (27): 10149–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403519101>.
- Lohmann, V, F Körner, U Herian, and R Bartenschlager. 1997. ‘Biochemical Properties of Hepatitis C Virus NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase and Identification of Amino Acid Sequence Motifs Essential for Enzymatic Activity.’ *Journal of Virology* 71 (11): 8416–28.
- Lohmann, V., F. Körner, J.-O. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. 1999. ‘Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line’. *Science* 285 (5424): 110–13. <https://doi.org/10.1126/science.285.5424.110>.

- Lu, Nu T., Catherine M. Crespi, Natalie M. Liu, James Q. Vu, Yasaman Ahmadi, Sheng Wu, Sherry Lin, et al. 2016. 'A Phase I Dose Escalation Study Demonstrates Quercetin Safety and Explores Potential for Bioflavonoid Antivirals in Patients with Chronic Hepatitis C'. *Phytotherapy Research: PTR* 30 (1): 160–68. <https://doi.org/10.1002/ptr.5518>.
- Lukavsky, Peter J. 2009. 'Structure and Function of HCV IRES Domains'. *Virus Research* 139 (2): 166–71. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.06.004>.
- Lundin, Marika, Magnus Monné, Anders Widell, Gunnar Von Heijne, and Mats A. A. Persson. 2003. 'Topology of the Membrane-Associated Hepatitis C Virus Protein NS4B'. *Journal of Virology* 77 (9): 5428–38. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.9.5428-5438.2003>.
- Lupberger, Joachim, Mirjam B. Zeisel, Fei Xiao, Christine Thumann, Isabel Fofana, Laetitia Zona, Christopher Davis, et al. 2011. 'EGFR and EphA2 Are Host Factors for Hepatitis C Virus Entry and Possible Targets for Antiviral Therapy'. *Nature Medicine* 17 (5): 589–95. <https://doi.org/10.1038/nm.2341>.

M

- Ma, Yinghong, Manu Anantpadma, Jennifer M. Timpe, Saravanabalaji Shanmugam, Sher M. Singh, Stanley M. Lemon, and Minkyung Yi. 2011. 'Hepatitis C Virus NS2 Protein Serves as a Scaffold for Virus Assembly by Interacting with Both Structural and Nonstructural Proteins'. *Journal of Virology* 85 (1): 86–97. <https://doi.org/10.1128/JVI.01070-10>.
- Ma, Yinghong, Jeremy Yates, Yuqiong Liang, Stanley M. Lemon, and MinKyung Yi. 2008. 'NS3 Helicase Domains Involved in Infectious Intracellular Hepatitis C Virus Particle Assembly'. *Journal of Virology* 82 (15): 7624–39. <https://doi.org/10.1128/JVI.00724-08>.
- Mailly, Laurent, Fei Xiao, Joachim Lupberger, Garrick K. Wilson, Philippe Aubert, François H. T. Duong, Diego Calabrese, et al. 2015. 'Clearance of Persistent Hepatitis C Virus Infection in Humanized Mice Using a Claudin-1-Targeting Monoclonal Antibody'. *Nature Biotechnology* 33 (5): 549–54. <https://doi.org/10.1038/nbt.3179>.
- Manns, Michael P., John G. McHutchison, Stuart C. Gordon, Vinod K. Rustgi, Mitchell Shiffman, Robert Reindollar, Zachary D. Goodman, Kenneth Koury, Mei-Hsiu Ling, and Janice 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'. *The Lancet* 358 (9286): 958–65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06102-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06102-5).
- Martin, Danyelle N., and Susan L. Uprichard. 2013. 'Identification of Transferrin Receptor 1 as a Hepatitis C Virus Entry Factor'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (26): 10777–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301764110>.
- Masaki, Takahiro, Satoko Matsunaga, Hirota Takahashi, Kenji Nakashima, Yayoi Kimura, Masahiko Ito, Mami Matsuda, et al. 2014. 'Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- α in Infectious Virus Production'. *Journal of Virology* 88 (13): 7541–55. <https://doi.org/10.1128/JVI.03170-13>.
- Masaki, Takahiro, Ryosuke Suzuki, Kyoko Murakami, Hideki Aizaki, Koji Ishii, Asako Murayama, Tomoko Date, et al. 2008. 'Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of Infectious Virus Particles'. *Journal of Virology* 82 (16): 7964–76. <https://doi.org/10.1128/JVI.00826-08>.
- Matter, K., and M. S. Balda. 1998. 'Biogenesis of Tight Junctions: The C-Terminal Domain of Occludin Mediates Basolateral Targeting'. *Journal of Cell Science* 111 (Pt 4) (February): 511–19.
- McCarthy, K. M., S. A. Francis, J. M. McCormack, J. Lai, R. A. Rogers, I. B. Skare, R. D. Lynch, and E. E. Schneeberger. 2000. 'Inducible Expression of Claudin-1-Myc but Not Occludin-VSV-G Results in Aberrant Tight Junction Strand Formation in MDCK Cells'. *Journal of Cell Science* 113 Pt 19 (October): 3387–98.
- McCarthy, K. M., I. B. Skare, M. C. Stankewich, M. Furuse, S. Tsukita, R. A. Rogers, R. D. Lynch, and E. E. Schneeberger. 1996. 'Occludin Is a Functional Component of the Tight Junction'. *Journal of Cell Science* 109 (9): 2287–98.

- McLauchlan, John, Marius K. Lemberg, Graham Hope, and Bruno Martoglio. 2002. 'Intramembrane Proteolysis Promotes Trafficking of Hepatitis C Virus Core Protein to Lipid Droplets'. *The EMBO Journal* 21 (15): 3980–88. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf414>.
- Mee, Christopher J., Helen J. Harris, Michelle J. Farquhar, Garrick Wilson, Gary Reynolds, Christopher Davis, Sven C. D. van IJendoorn, Peter Balfe, and Jane A. McKeating. 2009. 'Polarization Restricts Hepatitis C Virus Entry into HepG2 Hepatoma Cells'. *Journal of Virology* 83 (12): 6211–21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00246-09>.
- Meertens, Laurent, Claire Bertaux, Lisa Cukierman, Emmanuel Cormier, Dimitri Lavillette, François-Loïc Cosset, and Tatjana Dragic. 2008. 'The Tight Junction Proteins Claudin-1, -6, and -9 Are Entry Cofactors for Hepatitis C Virus'. *Journal of Virology* 82 (7): 3555–60. <https://doi.org/10.1128/JVI.01977-07>.
- Meertens, Laurent, Claire Bertaux, and Tatjana Dragic. 2006. 'Hepatitis C Virus Entry Requires a Critical Postinternalization Step and Delivery to Early Endosomes via Clathrin-Coated Vesicles'. *Journal of Virology* 80 (23): 11571–78. <https://doi.org/10.1128/JVI.01717-06>.
- Meola, A., A. Sbardellati, B. Bruni Ercole, M. Cerretani, M. Pezzanera, A. Ceccacci, A. Vitelli, et al. 2000. 'Binding of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein to CD81 Does Not Correlate with Species Permissiveness to Infection'. *Journal of Virology* 74 (13): 5933–38. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.13.5933-5938.2000>.
- Mercer, D. F., D. E. Schiller, J. F. Elliott, D. N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, W. R. Addison, et al. 2001. 'Hepatitis C Virus Replication in Mice with Chimeric Human Livers'. *Nature Medicine* 7 (8): 927–33. <https://doi.org/10.1038/90968>.
- Merz, Andreas, Gang Long, Marie-Sophie Hiet, Britta Brügger, Petr Chlanda, Patrice Andre, Felix Wieland, Jacomine Krijnse-Locker, and Ralf Bartenschlager. 2011. 'Biochemical and Morphological Properties of Hepatitis C Virus Particles and Determination of Their Lipidome'. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (4): 3018–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.175018>.
- Messina, Jane P., Isla Humphreys, Abraham Flaxman, Anthony Brown, Graham S. Cooke, Oliver G. Pybus, and Eleanor Barnes. 2015. 'Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 61 (1): 77–87. <https://doi.org/10.1002/hep.27259>.
- Meuleman, Philip, Maria Teresa Catanese, Lieven Verhoye, Isabelle Desombere, Ali Farhoudi, Christopher T. Jones, Timothy Sheahan, et al. 2012. 'A Human Monoclonal Antibody Targeting Scavenger Receptor Class B Type I Precludes Hepatitis C Virus Infection and Viral Spread in Vitro and in Vivo'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (2): 364–72. <https://doi.org/10.1002/hep.24692>.
- Meuleman, Philip, Joseph Hesselgesser, Matthew Paulson, Thomas Vanwolleghem, Isabelle Desombere, Hans Reiser, and Geert Leroux-Roels. 2008. 'Anti-CD81 Antibodies Can Prevent a Hepatitis C Virus Infection in Vivo'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48 (6): 1761–68. <https://doi.org/10.1002/hep.22547>.
- Meuleman, Philip, Louis Libbrecht, Rita De Vos, Bernard de Hemptinne, Kris Gevaert, Joël Vandekerckhove, Tania Roskams, and Geert Leroux-Roels. 2005. 'Morphological and Biochemical Characterization of a Human Liver in a UPA-SCID Mouse Chimera'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 41 (4): 847–56. <https://doi.org/10.1002/hep.20657>.
- Meunier, Jean-Christophe, Rodney S. Russell, Ronald E. Engle, Kristina N. Faulk, Robert H. Purcell, and Suzanne U. Emerson. 2008. 'Apolipoprotein C1 Association with Hepatitis C Virus'. *Journal of Virology* 82 (19): 9647–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.00914-08>.
- Meylan, Etienne, Joseph Curran, Kay Hofmann, Darius Moradpour, Marco Binder, Ralf Bartenschlager, and Jürg Tschopp. 2005. 'Cardif Is an Adaptor Protein in the RIG-I Antiviral Pathway and Is Targeted by Hepatitis C Virus'. *Nature* 437 (7062): 1167–72. <https://doi.org/10.1038/nature04193>.
- Millet, Jean Kaoru, François Kien, Chung-Yan Cheung, Yu-Lam Siu, Wing-Lim Chan, Huiying Li, Hiu-Lan Leung, et al. 2012. 'Ezrin Interacts with the SARS Coronavirus Spike Protein and Restrains Infection at the Entry Stage'. *PLOS ONE* 7 (11): e49566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049566>.

- Mitic, L. L., E. E. Schneeberger, A. S. Fanning, and J. M. Anderson. 1999. 'Connexin-Occludin Chimeras Containing the ZO-Binding Domain of Occludin Localize at MDCK Tight Junctions and NRK Cell Contacts'. *The Journal of Cell Biology* 146 (3): 683–93. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.3.683>.
- Miyanari, Yusuke, Kimie Atsuzawa, Nobuteru Usuda, Koichi Watashi, Takayuki Hishiki, Margarita Zayas, Ralf Bartenschlager, Takaji Wakita, Makoto Hijikata, and Kunitada Shimotohno. 2007. 'The Lipid Droplet Is an Important Organelle for Hepatitis C Virus Production'. *Nature Cell Biology* 9 (9): 1089–97. <https://doi.org/10.1038/ncb1631>.
- Mizui, Tomokazu, Shunhei Yamashina, Isei Tanida, Yoshiyuki Takei, Takashi Ueno, Naoya Sakamoto, Kenichi Ikejima, et al. 2010. 'Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Chloroquine Targeting Virus-Associated Autophagy'. *Journal of Gastroenterology* 45 (2): 195–203. <https://doi.org/10.1007/s00535-009-0132-9>.
- Molina, Sonia, Valerie Castet, Lydiane Pichard-Garcia, Czeslaw Wychowski, Eliane Meurs, Jean-Marc Pascussi, Camille Sureau, et al. 2008. 'Serum-Derived Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes Is Tetraspanin CD81 Dependent'. *Journal of Virology* 82 (1): 569–74. <https://doi.org/10.1128/JVI.01443-07>.
- Monazahian, M., I. Böhme, S. Bonk, A. Koch, C. Scholz, S. Grethe, and R. Thomssen. 1999. 'Low Density Lipoprotein Receptor as a Candidate Receptor for Hepatitis C Virus'. *Journal of Medical Virology* 57 (3): 223–29. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(199903\)57:3<223::aid-jmv2>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199903)57:3<223::aid-jmv2>3.0.co;2-4).
- Moradpour, Darius, Volker Brass, Elke Bieck, Peter Friebe, Rainer Gosert, Hubert E. Blum, Ralf Bartenschlager, François Penin, and Volker Lohmann. 2004. 'Membrane Association of the RNA-Dependent RNA Polymerase Is Essential for Hepatitis C Virus RNA Replication'. *Journal of Virology* 78 (23): 13278–84. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.23.13278-13284.2004>.
- Morgello, Susan, Jacinta Murray, Sarah Van Der Elst, and Desiree Byrd. 2014. 'HCV, but Not HIV, Is a Risk Factor for Cerebral Small Vessel Disease'. *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation* 1 (3). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000027>.
- Morin, Trevor J., Teresa J. Broering, Brett A. Leav, Barbra M. Blair, Kirk J. Rowley, Elisabeth N. Boucher, Yang Wang, et al. 2012. 'Human Monoclonal Antibody HCV1 Effectively Prevents and Treats HCV Infection in Chimpanzees'. *PLoS Pathogens* 8 (8): e1002895. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002895>.
- Moriya, K., H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, T. Tsutsumi, K. Ishibashi, Y. Matsuura, S. Kimura, T. Miyamura, and K. Koike. 1998. 'The Core Protein of Hepatitis C Virus Induces Hepatocellular Carcinoma in Transgenic Mice'. *Nature Medicine* 4 (9): 1065–67. <https://doi.org/10.1038/2053>.
- Morozov, Vladimir Alexei, and Sylvie Lagaye. 2018. 'Hepatitis C Virus: Morphogenesis, Infection and Therapy'. *World Journal of Hepatology* 10 (2): 186–212. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i2.186>.
- Mosley, Ralph T., Thomas E. Edwards, Eisuke Murakami, Angela M. Lam, Rena L. Grice, Jinfa Du, Michael J. Sofia, Philip A. Furman, and Michael J. Otto. 2012. 'Structure of Hepatitis C Virus Polymerase in Complex with Primer-Template RNA'. *Journal of Virology* 86 (12): 6503–11. <https://doi.org/10.1128/JVI.00386-12>.
- Moustafa, Savvina, Ioannis Karakasiliotis, and Penelope Mavromara. 2018. 'Hepatitis C Virus Core+1/ARF Protein Modulates the Cyclin D1/PRb Pathway and Promotes Carcinogenesis'. *Journal of Virology* 92 (9): e02036-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02036-17>.
- Muchmore, E., H. Popper, D. A. Peterson, M. F. Miller, and H. M. Lieberman. 1988. 'Non-A, Non-B Hepatitis-Related Hepatocellular Carcinoma in a Chimpanzee'. *Journal of Medical Primatology* 17 (5): 235–46.
- Murphy, Donald G., Erwin Sablon, Jasmine Chamberland, Eric Fournier, Raymond Dandavino, and Cécile L. Tremblay. 2015. 'Hepatitis C Virus Genotype 7, a New Genotype Originating from Central Africa'. *Journal of Clinical Microbiology* 53 (3): 967–72. <https://doi.org/10.1128/JCM.02831-14>.

N

- Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, and J. Sato. 1982. 'Growth of Human Hepatoma Cells Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium'. *Cancer Research* 42 (9): 3858–63.
- 'National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis C 2002 (June 10–12, 2002)'. 2002. *Gastroenterology* 123 (6): 2082–99. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.1232082>.
- Neddermann, Petra, Manuela Quintavalle, Chiara Di Pietro, Angelica Clementi, Mauro Cerretani, Sergio Altamura, Linda Bartholomew, and Raffaele De Francesco. 2004. 'Reduction of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation by Selective Inhibition of Cellular Kinases Activates Viral RNA Replication in Cell Culture'. *Journal of Virology* 78 (23): 13306–14. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.23.13306-13314.2004>.
- Nielsen, Søren U., Margaret F. Bassendine, Alastair D. Burt, Caroline Martin, Wanna Pumeechockchai, and Geoffrey L. Toms. 2006. 'Association between Hepatitis C Virus and Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL)/LDL Analyzed in Iodixanol Density Gradients'. *Journal of Virology* 80 (5): 2418–28. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2418-2428.2006>.
- Niepmann, Michael. 2009. 'Internal Translation Initiation of Picornaviruses and Hepatitis C Virus'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1789 (9–10): 529–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.05.002>.

O

- Okamoto, Kiyoko, Yoshio Mori, Yasumasa Komoda, Toru Okamoto, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Tetsuro Suzuki, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura. 2008. 'Intramembrane Processing by Signal Peptide Peptidase Regulates the Membrane Localization of Hepatitis C Virus Core Protein and Viral Propagation'. *Journal of Virology* 82 (17): 8349–61. <https://doi.org/10.1128/JVI.00306-08>.
- Osburn, William O., Anna E. Snider, Brittany L. Wells, Rachel Latanich, Justin R. Bailey, David L. Thomas, Andrea L. Cox, and Stuart C. Ray. 2014. 'Clearance of Hepatitis C Infection Is Associated with the Early Appearance of Broad Neutralizing Antibody Responses'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (6): 2140–51. <https://doi.org/10.1002/hep.27013>.

P

- Pacheco, Almudena, Sonia López de Quinto, Jorge Ramajo, Noemí Fernández, and Encarnación Martínez-Salas. 2009. 'A Novel Role for Gemin5 in mRNA Translation'. *Nucleic Acids Research* 37 (2): 582–90. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn979>.
- Paek, Ki Young, Chon Saeng Kim, Sung Mi Park, Jong Heon Kim, and Sung Key Jang. 2008. 'RNA-Binding Protein HnRNP D Modulates Internal Ribosome Entry Site-Dependent Translation of Hepatitis C Virus RNA'. *Journal of Virology* 82 (24): 12082–93. <https://doi.org/10.1128/JVI.01405-08>.
- Pang, Phillip S., Eckhard Jankowsky, Paul J. Planet, and Anna Marie Pyle. 2002. 'The Hepatitis C Viral NS3 Protein Is a Processive DNA Helicase with Cofactor Enhanced RNA Unwinding'. *The EMBO Journal* 21 (5): 1168–76. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.1168>.
- Paris, Luca, Laura Tonutti, Cristina Vannini, and Gianfranco Bazzoni. 2008. 'Structural Organization of the Tight Junctions'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Apical

- Junctional Complexes Part I, 1778 (3): 646–59.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.004>.
- Paul, David, Simone Hoppe, Gesine Saher, Jacomine Krijnse-Locker, and Ralf Bartenschlager. 2013. ‘Morphological and Biochemical Characterization of the Membranous Hepatitis C Virus Replication Compartment’. *Journal of Virology* 87 (19): 10612–27.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01370-13>.
- Paul, David, Vanesa Madan, and Ralf Bartenschlager. 2014. ‘Hepatitis C Virus RNA Replication and Assembly: Living on the Fat of the Land’. *Cell Host & Microbe* 16 (5): 569–79.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.008>.
- Penin, François, Volker Brass, Nicole Appel, Stephanie Ramboarina, Roland Montserret, Damien Ficheux, Hubert E. Blum, Ralf Bartenschlager, and Darius Moradpour. 2004. ‘Structure and Function of the Membrane Anchor Domain of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A’. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (39): 40835–43.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M404761200>.
- Pestka, Jan M., Mirjam B. Zeisel, Edith Bläser, Peter Schürmann, Birke Bartosch, Francois-Loïc Cosset, Arvind H. Patel, et al. 2007. ‘Rapid Induction of Virus-Neutralizing Antibodies and Viral Clearance in a Single-Source Outbreak of Hepatitis C’. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (14): 6025–30.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0607026104>.
- Petit, Jean Michel, Muriel Benichou, Laurence Duvillard, Valerie Jooste, Jean Baptiste Bour, Anne Minello, Bruno Verges, Jean Marcel Brun, Philippe Gambert, and Patrick Hillon. 2003. ‘Hepatitis C Virus-Associated Hypobetalipoproteinemia Is Correlated with Plasma Viral Load, Steatosis, and Liver Fibrosis’. *The American Journal of Gastroenterology* 98 (5): 1150–54.
<https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2003.07402.x>.
- Petracca, R., F. Falugi, G. Galli, N. Norais, D. Rosa, S. Campagnoli, V. Burgio, et al. 2000. ‘Structure-Function Analysis of Hepatitis C Virus Envelope-CD81 Binding’. *Journal of Virology* 74 (10): 4824–30.
<https://doi.org/10.1128/jvi.74.10.4824-4830.2000>.
- Phan, Tung, Rudolf K. F. Beran, Christopher Peters, Ivo C. Lorenz, and Brett D. Lindenbach. 2009. ‘Hepatitis C Virus NS2 Protein Contributes to Virus Particle Assembly via Opposing Epistatic Interactions with the E1-E2 Glycoprotein and NS3-NS4A Enzyme Complexes’. *Journal of Virology* 83 (17): 8379–95.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00891-09>.
- Pietschmann, Thomas, Artur Kaul, George Koutsoudakis, Anna Shavinskaya, Stephanie Kallis, Eike Steinmann, Karim Abid, et al. 2006. ‘Construction and Characterization of Infectious Intragenotypic and Intergenotypic Hepatitis C Virus Chimeras’. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (19): 7408–13.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0504877103>.
- Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A. J. Weiner, et al. 1998. ‘Binding of Hepatitis C Virus to CD81’. *Science (New York, N.Y.)* 282 (5390): 938–41.
<https://doi.org/10.1126/science.282.5390.938>.
- Ploss, Alexander, Matthew J. Evans, Valeriya A. Gaysinskaya, Maryline Panis, Hana You, Ype P. de Jong, and Charles M. Rice. 2009. ‘Human Occludin Is a Hepatitis C Virus Entry Factor Required for Infection of Mouse Cells’. *Nature* 457 (7231): 882–86.
<https://doi.org/10.1038/nature07684>.
- Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue, and N. Tordo. 1989. ‘Identification of Four Conserved Motifs among the RNA-Dependent Polymerase Encoding Elements’. *The EMBO Journal* 8 (12): 3867–74.
- Polaris Observatory HCV Collaborators. 2017. ‘Global Prevalence and Genotype Distribution of Hepatitis C Virus Infection in 2015: A Modelling Study’. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology* 2 (3): 161–76.
[https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30181-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30181-9).
- Poordad, Fred, Jonathan McCone, Bruce R. Bacon, Savino Bruno, Michael P. Manns, Mark S. Sulkowski, Ira M. Jacobson, et al. 2011. ‘Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection’. *The New England Journal of Medicine* 364 (13): 1195–1206.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1010494>.

- Popescu, Costin-Ioan, Nathalie Callens, Dave Trinel, Philippe Roingeard, Darius Moradpour, Véronique Descamps, Gilles Duverlie, et al. 2011. 'NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly'. *PLoS Pathogens* 7 (2): e1001278. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001278>.
- Poynard, T., P. Bedossa, and P. Opolon. 1997. 'Natural History of Liver Fibrosis Progression in Patients with Chronic Hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC Groups'. *Lancet (London, England)* 349 (9055): 825–32. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)07642-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)07642-8).
- Poynard, Thierry, Patrick Marcellin, Samuel S. Lee, Christian Niederau, Gerald S. Minuk, Gaetano Ido, Vincent Bain, et al. 1998. 'Randomised Trial of Interferon A2b plus Ribavirin for 48 Weeks or for 24 Weeks versus Interferon A2b plus Placebo for 48 Weeks for Treatment of Chronic Infection with Hepatitis C Virus'. *The Lancet* 352 (9138): 1426–32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)07124-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07124-4).
- Pumeechockchai, W., D. Bevitt, K. Agarwal, T. Petropoulou, B. C. A. Langer, B. Belohradsky, M. F. Bassendine, and G. L. Toms. 2002. 'Hepatitis C Virus Particles of Different Density in the Blood of Chronically Infected Immunocompetent and Immunodeficient Patients: Implications for Virus Clearance by Antibody'. *Journal of Medical Virology* 68 (3): 335–42. <https://doi.org/10.1002/jmv.10208>.

Q

- Qu, Xiaowang, Xiaoben Pan, Jessica Weidner, Wenquan Yu, Dominic Alonzi, Xiaodong Xu, Terry Butters, Timothy Block, Ju-Tao Guo, and Jinhong Chang. 2011. 'Inhibitors of Endoplasmic Reticulum Alpha-Glucosidases Potently Suppress Hepatitis C Virus Virion Assembly and Release'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (3): 1036–44. <https://doi.org/10.1128/AAC.01319-10>.
- Quintavalle, Manuela, Sonia Sambucini, Vincenzo Summa, Laura Orsatti, Fabio Talamo, Raffaele De Francesco, and Petra Neddermann. 2007. 'Hepatitis C Virus NS5A Is a Direct Substrate of Casein Kinase I-Alpha, a Cellular Kinase Identified by Inhibitor Affinity Chromatography Using Specific NS5A Hyperphosphorylation Inhibitors'. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (8): 5536–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610486200>.

R

- Radziewicz, Henry, Chris C. Ibegbu, Marina L. Fernandez, Kimberly A. Workowski, Kamil Obideen, Mohammad Wehbi, Holly L. Hanson, et al. 2007. 'Liver-Infiltrating Lymphocytes in Chronic Human Hepatitis C Virus Infection Display an Exhausted Phenotype with High Levels of PD-1 and Low Levels of CD127 Expression'. *Journal of Virology* 81 (6): 2545–53. <https://doi.org/10.1128/JVI.02021-06>.
- Radziewicz, Henry, Chris C. Ibegbu, Huiming Hon, Melissa K. Osborn, Kamil Obideen, Mohammad Wehbi, Gordon J. Freeman, et al. 2008. 'Impaired Hepatitis C Virus (HCV)-Specific Effector CD8+ T Cells Undergo Massive Apoptosis in the Peripheral Blood during Acute HCV Infection and in the Liver during the Chronic Phase of Infection'. *Journal of Virology* 82 (20): 9808–22. <https://doi.org/10.1128/JVI.01075-08>.
- Ran, F. Ann, Patrick D. Hsu, Jason Wright, Vineeta Agarwala, David A. Scott, and Feng Zhang. 2013. 'Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System'. *Nature Protocols* 8 (11): 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
- Ree, Meike H. van der, Adriaan J. van der Meer, Joep de Bruijne, Rael Maan, Andre van Vliet, Tania M. Welzel, Stefan Zeuzem, et al. 2014. 'Long-Term Safety and Efficacy of MicroRNA-Targeted Therapy in Chronic Hepatitis C Patients'. *Antiviral Research* 111 (November): 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.08.015>.

- Reiss, Simon, Ilka Rebhan, Perdita Backes, Ines Romero-Brey, Holger Erfle, Petr Matula, Lars Kaderali, et al. 2011. 'Recruitment and Activation of a Lipid Kinase by Hepatitis C Virus NS5A Is Essential for Integrity of the Membranous Replication Compartment'. *Cell Host & Microbe* 9 (1): 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.12.002>.
- Reynolds, Gary M., Helen J. Harris, Adam Jennings, Ke Hu, Joe Grove, Patricia F. Lalor, David H. Adams, Peter Balfe, Stefan G. Hübscher, and Jane A. McKeating. 2008. 'Hepatitis C Virus Receptor Expression in Normal and Diseased Liver Tissue'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47 (2): 418–27. <https://doi.org/10.1002/hep.22028>.
- Rhinds, David, and Louise Brissette. 2004. 'The Role of Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) in Lipid Trafficking. Defining the Rules for Lipid Traders'. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (1): 39–77. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00173-0](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00173-0).
- Rhim, J. A., E. P. Sandgren, J. L. Degen, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster. 1994. 'Replacement of Diseased Mouse Liver by Hepatic Cell Transplantation'. *Science (New York, N.Y.)* 263 (5150): 1149–52. <https://doi.org/10.1126/science.8108734>.
- Robertson, H. D., and M. B. Mathews. 1996. 'The Regulation of the Protein Kinase PKR by RNA'. *Biochimie* 78 (11–12): 909–14. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(97\)86712-0](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(97)86712-0).
- Roca Suarez, Armando Andres, Nicolaas Van Renne, Thomas F. Baumert, and Joachim Lupberger. 2018. 'Viral Manipulation of STAT3: Evade, Exploit, and Injure'. *PLoS Pathogens* 14 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006839>.
- Roingard, Philippe, Christophe Hourieux, Emmanuelle Blanchard, and Gérard Prensier. 2008. 'Hepatitis C Virus Budding at Lipid Droplet-Associated ER Membrane Visualized by 3D Electron Microscopy'. *Histochemistry and Cell Biology* 130 (3): 561–66. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0447-2>.
- Romero-Brey, Inés, Andreas Merz, Abhilash Chiramel, Ji-Young Lee, Petr Chlanda, Uta Haselman, Rachel Santarella-Mellwig, et al. 2012. 'Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication'. *PLoS Pathogens* 8 (12): e1003056. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003056>.
- Rosa, D, S Campagnoli, C Moretto, E Guenzi, L Cousens, M Chin, C Dong, et al. 1996. 'A Quantitative Test to Estimate Neutralizing Antibodies to the Hepatitis C Virus: Cytofluorimetric Assessment of Envelope Glycoprotein 2 Binding to Target Cells.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (5): 1759–63.
- Rushbrook, Simon M., Scott M. Ward, Esther Unitt, Sarah L. Vowler, Michaela Lucas, Paul Klenerman, and Graeme J. M. Alexander. 2005. 'Regulatory T Cells Suppress in Vitro Proliferation of Virus-Specific CD8+ T Cells during Persistent Hepatitis C Virus Infection'. *Journal of Virology* 79 (12): 7852–59. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7852-7859.2005>.
- Rust, Michael J., Melike Lakadamyali, Feng Zhang, and Xiaowei Zhuang. 2004. 'Assembly of Endocytic Machinery around Individual Influenza Viruses during Viral Entry'. *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (6): 567–73. <https://doi.org/10.1038/nsmb769>.

S

- Sainz, Bruno, Naina Barretto, Danyelle N. Martin, Nobuhiko Hiraga, Michio Imamura, Snawar Hussain, Katherine A. Marsh, et al. 2012. 'Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 Cholesterol Absorption Receptor as a New Hepatitis C Virus Entry Factor'. *Nature Medicine* 18 (2): 281–85. <https://doi.org/10.1038/nm.2581>.
- Saitou, M., M. Furuse, H. Sasaki, J. D. Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda, and S. Tsukita. 2000. 'Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands'. *Molecular Biology of the Cell* 11 (12): 4131–42. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4131>.
- Sakai, Akito, Marisa St Claire, Kristina Faulk, Sugantha Govindarajan, Suzanne U. Emerson, Robert H. Purcell, and Jens Bukh. 2003. 'The P7 Polypeptide of Hepatitis C Virus Is Critical for Infectivity and Contains Functionally Important Genotype-Specific Sequences'. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (20): 11646–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834545100>.
- Santolini, E., L. Pacini, C. Fipaldini, G. Migliaccio, and N. Monica. 1995. ‘The NS2 Protein of Hepatitis C Virus Is a Transmembrane Polypeptide’. *Journal of Virology* 69 (12): 7461–71.
- Sarrazin, Christoph, Tara L. Kieffer, Doug Bartels, Brian Hanzelka, Ute Müh, Martin Welker, Dennis Wincheringer, et al. 2007. ‘Dynamic Hepatitis C Virus Genotypic and Phenotypic Changes in Patients Treated with the Protease Inhibitor Telaprevir’. *Gastroenterology* 132 (5): 1767–77. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.037>.
- Sarrazin, Stephane, William C. Lamanna, and Jeffrey D. Esko. 2011. ‘Heparan Sulfate Proteoglycans’. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004952>.
- Sawatsubashi, Shun, Yudai Joko, Seiji Fukumoto, Toshio Matsumoto, and Shigeo S. Sugano. 2018. ‘Development of Versatile Non-Homologous End Joining-Based Knock-in Module for Genome Editing’. *Scientific Reports* 8 (1): 593. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18911-9>.
- Scarselli, Elisa, Helenia Ansuini, Raffaele Cerino, Rosa Maria Roccasecca, Stefano Acali, Gessica Filocamo, Cinzia Traboni, Alfredo Nicosia, Riccardo Cortese, and Alessandra Vitelli. 2002. ‘The Human Scavenger Receptor Class B Type I Is a Novel Candidate Receptor for the Hepatitis C Virus’. *The EMBO Journal* 21 (19): 5017–25. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf529>.
- Schaar, Hilde M. van der, Michael J. Rust, Chen Chen, Heidi van der Ende-Metselaar, Jan Wilschut, Xiaowei Zhuang, and Jolanda M. Smit. 2008. ‘Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells’. *PLoS Pathogens* 4 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000244>.
- Schaefer, Esperance A. K., James Meixiong, Christina Mark, Amy Deik, Daniel L. Motola, Dahlene Fusco, Andrew Yang, et al. 2016. ‘Apolipoprotein B100 Is Required for Hepatitis C Infectivity and Mipomersen Inhibits Hepatitis C’. *World Journal of Gastroenterology* 22 (45): 9954–65. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i45.9954>.
- Scheel, Troels K H, and Charles M Rice. 2013. ‘Understanding the Hepatitis C Virus Life Cycle Paves the Way for Highly Effective Therapies’. *Nature Medicine* 19 (7): 837–49. <https://doi.org/10.1038/nm.3248>.
- Scheel, Troels K. H., Peter Simmonds, and Amit Kapoor. 2015. ‘Surveying the Global Virome: Identification and Characterization of HCV-Related Animal Hepaciviruses’. *Antiviral Research* 115 (March): 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.014>.
- Scheller, Nicoletta, Leonardo Bruno Mina, Rui Pedro Galão, Ashwin Chari, Mireia Giménez-Barcons, Amine Noueiry, Utz Fischer, Andreas Meyerhans, and Juana Díez. 2009. ‘Translation and Replication of Hepatitis C Virus Genomic RNA Depends on Ancient Cellular Proteins That Control mRNA Fates’. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (32): 13517–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906413106>.
- Schmidt, Julia, Robert Thimme, and Christoph Neumann-Haefelin. 2011. ‘Host Genetics in Immune-Mediated Hepatitis C Virus Clearance’. *Biomarkers in Medicine* 5 (2): 155–69. <https://doi.org/10.2217/bmm.11.19>.
- 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’. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (47): 44052–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103358200>.
- Schulze zur Wiesch, Julian, Georg M. Lauer, Cheryl L. Day, Arthur Y. Kim, Kei Ouchi, Jared E. Duncan, Alysse G. Wurcel, et al. 2005. ‘Broad Repertoire of the CD4+ Th Cell Response in Spontaneously Controlled Hepatitis C Virus Infection Includes Dominant and Highly Promiscuous Epitopes’. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (6): 3603–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.6.3603>.
- Schuppan, Detlef, and Nezam H. Afdhal. 2008. ‘Liver Cirrhosis’. *Lancet* 371 (9615): 838–51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60383-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60383-9).

- Sebastiani, Giada, Konstantinos Gkouvatsos, and Kostas Pantopoulos. 2014. 'Chronic Hepatitis C and Liver Fibrosis'. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20 (32): 11033–53. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i32.11033>.
- Selby, M. J., E. Glazer, F. Masiarz, and M. Houghton. 1994. 'Complex Processing and Protein:Protein Interactions in the E2:NS2 Region of HCV'. *Virology* 204 (1): 114–22. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1515>.
- Serafino, A., M. B. Valli, A. Alessandrini, A. Ponzetto, G. Carloni, and L. Bertolini. 1997. 'Ultrastructural Observations of Viral Particles within Hepatitis C Virus-Infected Human B Lymphoblastoid Cell Line'. *Research in Virology* 148 (2): 153–59.
- Seth, Rashu B., Lijun Sun, Chee-Kwee Ea, and Zhijian J. Chen. 2005. 'Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein That Activates NF-KappaB and IRF 3'. *Cell* 122 (5): 669–82. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.012>.
- Shaner, Nathan C., Michael Z. Lin, Michael R. McKeown, Paul A. Steinbach, Kristin L. Hazelwood, Michael W. Davidson, and Roger Y. Tsien. 2008. 'Improving the Photostability of Bright Monomeric Orange and Red Fluorescent Proteins'. *Nature Methods* 5 (6): 545–51. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1209>.
- Shavinskaya, Anna, Steeve Boulant, Francois Penin, John McLauchlan, and Ralf Bartenschlager. 2007. 'The Lipid Droplet Binding Domain of Hepatitis C Virus Core Protein Is a Major Determinant for Efficient Virus Assembly'. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (51): 37158–69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707329200>.
- Shen, Le, Christopher R. Weber, and Jerrold R. Turner. 2008. 'The Tight Junction Protein Complex Undergoes Rapid and Continuous Molecular Remodeling at Steady State'. *The Journal of Cell Biology* 181 (4): 683–95. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711165>.
- Shimakami, Tetsuro, Daisuke Yamane, Christoph Welsch, Lucinda Hensley, Rohit K. Jangra, and Stanley M. Lemon. 2012. 'Base Pairing between Hepatitis C Virus RNA and MicroRNA 122 3' of Its Seed Sequence Is Essential for Genome Stabilization and Production of Infectious Virus'. *Journal of Virology* 86 (13): 7372–83. <https://doi.org/10.1128/JVI.00513-12>.
- Shimizu, Y. K., S. M. Feinstone, M. Kohara, R. H. Purcell, and H. Yoshikura. 1996. 'Hepatitis C Virus: Detection of Intracellular Virus Particles by Electron Microscopy'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 23 (2): 205–9. <https://doi.org/10.1002/hep.510230202>.
- Shimizu, Y. K., S. M. Feinstone, R. H. Purcell, H. J. Alter, and W. T. London. 1979. 'Non-A, Non-B Hepatitis: Ultrastructural Evidence for Two Agents in Experimentally Infected Chimpanzees'. *Science (New York, N.Y.)* 205 (4402): 197–200. <https://doi.org/10.1126/science.451589>.
- Shimizu, Y. K., A. J. Weiner, J. Rosenblatt, D. C. Wong, M. Shapiro, T. Popkin, M. Houghton, H. J. Alter, and R. H. Purcell. 1990. 'Early Events in Hepatitis C Virus Infection of Chimpanzees'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (16): 6441–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.16.6441>.
- Shimizu, Yoshimi, Yoshitaka Shirasago, Masuo Kondoh, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Kiyohito Yagi, and Masayoshi Fukasawa. 2018. 'Monoclonal Antibodies against Occludin Completely Prevented Hepatitis C Virus Infection in a Mouse Model'. *Journal of Virology* 92 (8). <https://doi.org/10.1128/JVI.02258-17>.
- Shin, Eui-Cheol, Ulrike Seifert, Takanobu Kato, Charles M. Rice, Stephen M. Feinstone, Peter-M. Kloetzel, and Barbara Rehmann. 2006. 'Virus-Induced Type I IFN Stimulates Generation of Immunoproteasomes at the Site of Infection'. *Journal of Clinical Investigation* 116 (11): 3006–14. <https://doi.org/10.1172/JCI29832>.
- Shin, Eui-Cheol, Pil Soo Sung, and Su-Hyung Park. 2016. 'Immune Responses and Immunopathology in Acute and Chronic Viral Hepatitis'. *Nature Reviews. Immunology* 16 (8): 509–23. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.69>.
- Shoukry, Naglaa H., Arash Grakoui, Michael Houghton, David Y. Chien, John Ghayeb, Keith A. Reimann, and Christopher M. Walker. 2003. 'Memory CD8+ T Cells Are Required for Protection from Persistent Hepatitis C Virus Infection'. *The Journal of Experimental Medicine* 197 (12): 1645–55. <https://doi.org/10.1084/jem.20030239>.
- Shoukry, Naglaa H., John Sidney, Alessandro Sette, and Christopher M. Walker. 2004. 'Conserved Hierarchy of Helper T Cell Responses in a Chimpanzee during Primary and Secondary

- Hepatitis C Virus Infections'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (1): 483–92. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.483>.
- Simister, Philip, Melanie Schmitt, Matthis Geitmann, Oliver Wicht, U. Helena Danielson, Rahel Klein, Stéphane Bressanelli, and Volker Lohmann. 2009. 'Structural and Functional Analysis of Hepatitis C Virus Strain JFH1 Polymerase'. *Journal of Virology* 83 (22): 11926–39. <https://doi.org/10.1128/JVI.01008-09>.
- Simmonds, P., A. Alberti, H. J. Alter, F. Bonino, D. W. Bradley, C. Brechot, J. T. Brouwer, S. W. Chan, K. Chayama, and D. S. Chen. 1994. 'A Proposed System for the Nomenclature of Hepatitis C Viral Genotypes'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 19 (5): 1321–24.
- 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'. *Journal of General Virology*, 74 (11): 2391–99. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-11-2391>.
- Simmonds, Peter, Paul Becher, Jens Bukh, Ernest A Gould, Gregor Meyers, Tom Monath, Scott Muerhoff, et al. 2017. 'ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae'. *The Journal of General Virology* 98 (1): 2–3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>.
- Smith, Donald B., Jens Bukh, Carla Kuiken, A. Scott Muerhoff, Charles M. Rice, Jack T. Stapleton, and Peter Simmonds. 2014. 'Expanded Classification of Hepatitis C Virus into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (1): 318–27. <https://doi.org/10.1002/hep.26744>.
- Sonenberg, Nahum, and Alan G. Hinnebusch. 2009. 'Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets'. *Cell* 136 (4): 731–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>.
- Song, Yutong, Peter Friebe, Eleni Tzima, Christiane Jünemann, Ralf Bartenschlager, and Michael Niepmann. 2006. 'The Hepatitis C Virus RNA 3'-Untranslated Region Strongly Enhances Translation Directed by the Internal Ribosome Entry Site'. *Journal of Virology* 80 (23): 11579–88. <https://doi.org/10.1128/JVI.00675-06>.
- Sourisseau, Marion, Maria L. Michta, Chati Zony, Benjamin Israelow, Sharon E. Hopcraft, Christopher M. Narbus, Ana Parra Martín, and Matthew J. Evans. 2013. 'Temporal Analysis of Hepatitis C Virus Cell Entry with Occludin Directed Blocking Antibodies'. *PLoS Pathogens* 9 (3): e1003244. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003244>.
- Spångberg, K., and S. Schwartz. 1999. 'Poly(C)-Binding Protein Interacts with the Hepatitis C Virus 5' Untranslated Region'. *The Journal of General Virology* 80 (Pt 6) (June): 1371–76. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-6-1371>.
- Steinmann, Eike, Christiane Brohm, Stephanie Kallis, Ralf Bartenschlager, and Thomas Pietschmann. 2008. 'Efficient Trans-Encapsidation of Hepatitis C Virus RNAs into Infectious Virus-Like Particles'. *Journal of Virology* 82 (14): 7034–46. <https://doi.org/10.1128/JVI.00118-08>.
- Steinmann, Eike, Francois Penin, Stephanie Kallis, Arvind H. Patel, Ralf Bartenschlager, and Thomas Pietschmann. 2007. 'Hepatitis C Virus P7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions'. *PLoS Pathogens* 3 (7): e103. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030103>.
- Stiasny, Karin, Richard Fritz, Karen Pangerl, and Franz X. Heinz. 2011. 'Molecular Mechanisms of Flavivirus Membrane Fusion'. *Amino Acids* 41 (5): 1159–63. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0370-4>.
- Strader, Doris B., and Leonard B. Seeff. 2012. 'A Brief History of the Treatment of Viral Hepatitis C'. *Clinical Liver Disease* 1 (1): 6–11. <https://doi.org/10.1002/cld.1>.
- Sugimoto, Kazushi, Fusao Ikeda, Jason Stadanlick, Frederick A. Nunes, Harvey J. Alter, and Kyong-Mi Chang. 2003. 'Suppression of HCV-Specific T Cells without Differential Hierarchy Demonstrated Ex Vivo in Persistent HCV Infection'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 38 (6): 1437–48. <https://doi.org/10.1016/j.hep.2003.09.026>.
- Sumpter, Rhea, Yueh-Ming Loo, Eileen Foy, Kui Li, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Stanley M. Lemon, and Michael Gale. 2005. 'Regulating Intracellular Antiviral Defense and Permissiveness to Hepatitis C Virus RNA Replication through a Cellular RNA Helicase, RIG-I'. *Journal of Virology* 79 (5): 2689–99. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2689-2699.2005>.

- Sung, Vicky M.-H., Shigetaka Shimodaira, Alison L. Doughty, Gaston R. Picchio, Huong Can, T. S. Benedict Yen, Karen L. Lindsay, Alexandra M. Levine, and Michael M. C. Lai. 2003. 'Establishment of B-Cell Lymphoma Cell Lines Persistently Infected with Hepatitis C Virus In Vivo and In Vitro: The Apoptotic Effects of Virus Infection'. *Journal of Virology* 77 (3): 2134–46. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.3.2134-2146.2003>.
- Susser, Simone, Christoph Welsch, Yalan Wang, Markus Zettler, Francisco S. Domingues, Ursula Karey, Eric Hughes, et al. 2009. 'Characterization of Resistance to the Protease Inhibitor Boceprevir in Hepatitis C Virus-Infected Patients'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50 (6): 1709–18. <https://doi.org/10.1002/hep.23192>.
- Suzuki, Keiichiro, Yuji Tsunekawa, Reyna Hernandez-Benitez, Jun Wu, Jie Zhu, Euseok J. Kim, Fumiyouki Hatanaka, et al. 2016. 'In Vivo Genome Editing via CRISPR/Cas9 Mediated Homology-Independent Targeted Integration'. *Nature* 540 (7631): 144–49. <https://doi.org/10.1038/nature20565>.
- Syder, Andrew J., Haekyung Lee, Mirjam B. Zeisel, Joe Grove, Eric Soulier, James Macdonald, Stephine Chow, et al. 2011. 'Small Molecule Scavenger Receptor BI Antagonists Are Potent HCV Entry Inhibitors'. *Journal of Hepatology* 54 (1): 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.06.024>.

T

- Takahashi, K., S. Kishimoto, H. Yoshizawa, H. Okamoto, A. Yoshikawa, and S. Mishiro. 1992. 'P26 Protein and 33-Nm Particle Associated with Nucleocapsid of Hepatitis C Virus Recovered from the Circulation of Infected Hosts'. *Virology* 191 (1): 431–34. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90204-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90204-3).
- Takeuchi, Osamu, and Shizuo Akira. 2009. 'Innate Immunity to Virus Infection'. *Immunological Reviews* 227 (1): 75–86. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x>.
- Tanaka, T., N. Kato, M. J. Cho, K. Sugiyama, and K. Shimotohno. 1996. 'Structure of the 3' Terminus of the Hepatitis C Virus Genome'. *Journal of Virology* 70 (5): 3307–12.
- Tellinghuisen, Timothy L., Katie L. Foss, and Jason Treadaway. 2008. 'Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein'. *PLoS Pathogens* 4 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000032>.
- Tellinghuisen, Timothy L., Joseph Marcotrigiano, Alexander E. Gorbalenya, and Charles M. Rice. 2004. 'The NS5A Protein of Hepatitis C Virus Is a Zinc Metalloprotein'. *Journal of Biological Chemistry* 279 (47): 48576–87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407787200>.
- Tellinghuisen, Timothy L., Joseph Marcotrigiano, and Charles M. Rice. 2005. 'Structure of the Zinc-Binding Domain of an Essential Replicase Component of Hepatitis C Virus Reveals a Novel Fold'. *Nature* 435 (7040): 374–79. <https://doi.org/10.1038/nature03580>.
- Terrault, Norah A., Jennifer L. Dodge, Edward L. Murphy, John E. Tavis, Alexi Kiss, T. R. Levin, Robert G. Gish, Michael P. Busch, Arthur L. Reingold, and Miriam J. Alter. 2013. 'Sexual Transmission of Hepatitis C Virus among Monogamous Heterosexual Couples: The HCV Partners Study'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 57 (3): 881–89. <https://doi.org/10.1002/hep.26164>.
- Than, Thoa T., Giao V. Q. Tran, Kidong Son, Eun-Mee Park, Seungtaek Kim, Yun-Sook Lim, and Soon B. Hwang. 2016. 'Ankyrin Repeat Domain 1 Is Up-Regulated During Hepatitis C Virus Infection and Regulates Hepatitis C Virus Entry'. *Scientific Reports* 6 (February): 20819. <https://doi.org/10.1038/srep20819>.
- Thimme, R., D. Oldach, K. M. Chang, C. Steiger, S. C. Ray, and F. V. Chisari. 2001. 'Determinants of Viral Clearance and Persistence during Acute Hepatitis C Virus Infection'. *The Journal of Experimental Medicine* 194 (10): 1395–1406. <https://doi.org/10.1084/jem.194.10.1395>.
- Thomas, David L., Chloe L. Thio, Maureen P. Martin, Ying Qi, Dongliang Ge, Colm O'hUigin, Judith Kidd, et al. 2009. 'Genetic Variation in IL28B and Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus'. *Nature* 461 (7265): 798–801. <https://doi.org/10.1038/nature08463>.

- Thomssen, R., S. Bonk, C. Propfe, K. H. Heermann, H. G. Köchel, and A. Uy. 1992. 'Association of Hepatitis C Virus in Human Sera with Beta-Lipoprotein'. *Medical Microbiology and Immunology* 181 (5): 293–300.
- Thorpe, Lorna E., Lawrence J. Ouellet, Ronald Hershov, Susan L. Bailey, Ian T. Williams, John Williamson, Edgar R. Monterroso, and Richard S. Garfein. 2002. 'Risk of Hepatitis C Virus Infection among Young Adult Injection Drug Users Who Share Injection Equipment'. *American Journal of Epidemiology* 155 (7): 645–53. <https://doi.org/10.1093/aje/155.7.645>.
- Timpe, Jennifer M., Zania Stamataki, Adam Jennings, Ke Hu, Michelle J. Farquhar, Helen J. Harris, Anne Schwarz, et al. 2008. 'Hepatitis C Virus Cell-Cell Transmission in Hepatoma Cells in the Presence of Neutralizing Antibodies'. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47 (1): 17–24. <https://doi.org/10.1002/hep.21959>.
- Tomei, L., C. Failla, E. Santolini, R. De Francesco, and N. La Monica. 1993. 'NS3 Is a Serine Protease Required for Processing of Hepatitis C Virus Polyprotein'. *Journal of Virology* 67 (7): 4017–26.
- Torre, Lindsey A., Freddie Bray, Rebecca L. Siegel, Jacques Ferlay, Joannie Lortet-Tieulent, and Ahmedin Jemal. 2015. 'Global Cancer Statistics, 2012'. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65 (2): 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Torres-Flores, Jesús M., and Carlos F. Arias. 2015. 'Tight Junctions Go Viral!' *Viruses* 7 (9): 5145–54. <https://doi.org/10.3390/v7092865>.
- Tovo, P. A., E. Palomba, G. Ferraris, N. Principi, E. Ruga, P. Dallacasa, and A. Maccabruni. 1997. 'Increased Risk of Maternal-Infant Hepatitis C Virus Transmission for Women Coinfected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. Italian Study Group for HCV Infection in Children'. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 25 (5): 1121–24. <https://doi.org/10.1086/516102>.
- Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. 2001. 'Multifunctional Strands in Tight Junctions'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (4): 285–93. <https://doi.org/10.1038/35067088>.

U

- Ujino, Saneyuki, Hironori Nishitsuji, Takayuki Hishiki, Kazuo Sugiyama, Hiroshi Takaku, and Kunitada Shimotohno. 2016. 'Hepatitis C Virus Utilizes VLDLR as a Novel Entry Pathway'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (1): 188–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506524113>.

V

- Van Eck, Miranda, Menno Hoekstra, Ruud Out, I. Sophie T. Bos, J. Kar Kruijt, Reeni B. Hildebrand, and Theo J. C. Van Berkel. 2008. 'Scavenger Receptor BI Facilitates the Metabolism of VLDL Lipoproteins in Vivo'. *Journal of Lipid Research* 49 (1): 136–46. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700355-JLR200>.
- Van Itallie, Christina M., Amber Jean Tietgens, and James M. Anderson. 2017. 'Visualizing the Dynamic Coupling of Claudin Strands to the Actin Cytoskeleton through ZO-1'. *Molecular Biology of the Cell* 28 (4): 524–34. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-10-0698>.
- Varaklioti, Agoritsa, Niki Vassilaki, Urania Georgopoulou, and Penelope Mavromara. 2002. 'Alternate Translation Occurs within the Core Coding Region of the Hepatitis C Viral Genome'. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (20): 17713–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201722200>.
- Venkatraman, Srikanth, Stéphane L. Bogen, Ashok Arasappan, Frank Bennett, Kevin Chen, Edwin Jao, Yi-Tsung Liu, et al. 2006. 'Discovery of (1R,5S)-N-[3-Amino-1-(Cyclobutylmethyl)-2,3-Dioxopropyl]-3-[2(S)-[[[(1,1-Dimethylethyl)Amino]Carbonyl]Amino]-3,3-Dimethyl-1-Oxobutyl]-6,6-Dimethyl-3-Azabicyclo[3.1.0]Hexan-2(S)-Carboxamide (SCH 503034), a Selective, Potent, Orally Bioavailable Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor: A Potential

- Therapeutic Agent for the Treatment of Hepatitis C Infection'. *Journal of Medicinal Chemistry* 49 (20): 6074–86. <https://doi.org/10.1021/jm060325b>.
- Verdegem, Dries, Aurélie Badillo, Jean-Michel Wieruszkeski, Isabelle Landrieu, Arnaud Leroy, Ralf Bartenschlager, François Penin, Guy Lippens, and Xavier Hanouille. 2011. 'Domain 3 of NS5A Protein from the Hepatitis C Virus Has Intrinsic Alpha-Helical Propensity and Is a Substrate of Cyclophilin A'. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (23): 20441–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.182436>.
- Vieyres, Gabrielle, Christiane Brohm, Martina Friesland, Juliane Gentsch, Benno Wölk, Philippe Roingeard, Eike Steinmann, and Thomas Pietschmann. 2013. 'Subcellular Localization and Function of an Epitope-Tagged P7 Viroprotein in Hepatitis C Virus-Producing Cells'. *Journal of Virology* 87 (3): 1664–78. <https://doi.org/10.1128/JVI.02782-12>.
- Vogt, Dorothee A., Grégory Camus, Eva Herker, Brian R. Webster, Chia-Lin Tsou, Warner C. Greene, Tien-Sze Benedict Yen, and Melanie Ott. 2013. 'Lipid Droplet-Binding Protein TIP47 Regulates Hepatitis C Virus RNA Replication through Interaction with the Viral NS5A Protein'. *PLoS Pathogens* 9 (4): e1003302. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003302>.
- Voisset, Cécile, Nathalie Callens, Emmanuelle Blanchard, Anne Op De Beeck, Jean Dubuisson, and Ngoc Vu-Dac. 2005. 'High Density Lipoproteins Facilitate Hepatitis C Virus Entry through the Scavenger Receptor Class B Type I'. *Journal of Biological Chemistry* 280 (9): 7793–99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411600200>.

W

- Wakita, Takaji, Thomas Pietschmann, Takanobu Kato, Tomoko Date, Michiko Miyamoto, Zijiang Zhao, Krishna Murthy, et al. 2005. 'Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome'. *Nature Medicine* 11 (7): 791–96. <https://doi.org/10.1038/nm1268>.
- Walewski, J. L., T. R. Keller, D. D. Stump, and A. D. Branch. 2001. 'Evidence for a New Hepatitis C Virus Antigen Encoded in an Overlapping Reading Frame'. *RNA (New York, N.Y.)* 7 (5): 710–21. <https://doi.org/10.1017/s1355838201010111>.
- Walter, J. K., V. Castro, M. Voss, K. Gast, C. Rueckert, J. Piontek, and Ingolf E. Blasig. 2009. 'Redox-Sensitivity of the Dimerization of Occludin'. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 66 (22): 3655–62. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0150-z>.
- Walter, Juliane K., Christine Rueckert, Martin Voss, S. L. Mueller, Jörg Piontek, Klaus Gast, and Ingolf E. Blasig. 2009. 'The Oligomerization of the Coiled Coil-Domain of Occludin Is Redox Sensitive'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165 (May): 19–27. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04058.x>.
- Wang, C., S. Y. Le, N. Ali, and A. Siddiqui. 1995. 'An RNA Pseudoknot Is an Essential Structural Element of the Internal Ribosome Entry Site Located within the Hepatitis C Virus 5' Noncoding Region'. *RNA (New York, N.Y.)* 1 (5): 526–37.
- Wang, H., X. T. Shen, R. Ye, S. Y. Lan, L. Xiang, and Z. H. Yuan. 2005. 'Roles of the Polypyrimidine Tract and 3' Noncoding Region of Hepatitis C Virus RNA in the Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation'. *Archives of Virology* 150 (6): 1085–99. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0491-3>.
- Watashi, Koichi, Naoto Ishii, Makoto Hijikata, Daisuke Inoue, Takayuki Murata, Yusuke Miyanari, and Kunitada Shimotohno. 2005. 'Cyclophilin B Is a Functional Regulator of Hepatitis C Virus RNA Polymerase'. *Molecular Cell* 19 (1): 111–22. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.05.014>.
- Wee, Ping, and Zhixiang Wang. 2017. 'Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways'. *Cancers* 9 (5). <https://doi.org/10.3390/cancers9050052>.
- Weiner, A. J., M. J. Brauer, J. Rosenblatt, K. H. Richman, J. Tung, K. Crawford, F. Bonino, G. Saracco, Q. L. Choo, and M. Houghton. 1991. 'Variable and Hypervariable Domains Are Found in the Regions of HCV Corresponding to the Flavivirus Envelope and NS1 Proteins

- and the Pestivirus Envelope Glycoproteins'. *Virology* 180 (2): 842–48. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90104-j](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90104-j).
- Welbourn, Sarah, Robin Green, Isabelle Gamache, Serge Dandache, Volker Lohmann, Ralf Bartenschlager, Karen Meerovitch, and Arnim Pause. 2005. 'Hepatitis C Virus NS2/3 Processing Is Required for NS3 Stability and Viral RNA Replication'. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (33): 29604–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505019200>.
- Westbrook, Rachel H., and Geoffrey Dusheiko. 2014. 'Natural History of Hepatitis C'. *Journal of Hepatology* 61 (1): S58–68. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.012>.
- White, Judith M., and Gary R. Whittaker. 2016. 'Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes'. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 17 (6): 593–614. <https://doi.org/10.1111/tra.12389>.
- Wilkinson, Jeffrey, Marek Radkowski, and Tomasz Laskus. 2009. 'Hepatitis C Virus Neuroinvasion: Identification of Infected Cells'. *Journal of Virology* 83 (3): 1312–19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01890-08>.
- Witteveldt, Jeroen, Matthew J. Evans, Julia Bitzegeio, George Koutsoudakis, Ania M. Owsianka, Allan G. N. Angus, Zhen-Yong Keck, et al. 2009. 'CD81 Is Dispensable for Hepatitis C Virus Cell-to-Cell Transmission in Hepatoma Cells'. *The Journal of General Virology* 90 (Pt 1): 48–58. <https://doi.org/10.1099/vir.0.006700-0>.
- Wong, Vivian, and Barry M. Gumbiner. 1997. 'A Synthetic Peptide Corresponding to the Extracellular Domain of Occludin Perturbs the Tight Junction Permeability Barrier'. *The Journal of Cell Biology* 136 (2): 399–409. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.2.399>.
- Wozniak, Ann L., Stephen Griffin, David Rowlands, Mark Harris, MinKyung Yi, Stanley M. Lemon, and Steven 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001087>.
- Wrensch, Florian, Emilie Crouchet, Gaetan Ligat, Mirjam B. Zeisel, Zhen-Yong Keck, Steven K. H. Fong, Catherine Schuster, and Thomas F. Baumert. 2018. 'Hepatitis C Virus (HCV)–Apolipoprotein Interactions and Immune Evasion and Their Impact on HCV Vaccine Design'. *Frontiers in Immunology* 9 (June). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01436>.
- Wu, Xianfang, Emily M. Lee, Christy Hammack, Jason M. Robotham, Mausumi Basu, Jianshe Lang, Margo A. Brinton, and Hengli Tang. 2014. 'Cell Death-Inducing DFFA-like Effector b Is Required for Hepatitis C Virus Entry into Hepatocytes'. *Journal of Virology* 88 (15): 8433–44. <https://doi.org/10.1128/JVI.00081-14>.

X

- Xu, Zhenming, Jinah Choi, T.S. Benedict Yen, Wen Lu, Anne Strohecker, Sugantha Govindarajan, David Chien, Mark J. Selby, and Jing-hsiung Ou. 2001. 'Synthesis of a Novel Hepatitis C Virus Protein by Ribosomal Frameshift'. *The EMBO Journal* 20 (14): 3840–48. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3840>.
- Xu, Yan, Pierre Martinez, Karin Séron, Guangxiang Luo, Fabrice Allain, Jean Dubuisson, and Sandrine Belouzard. 2015. 'Characterization of Hepatitis C Virus Interaction with Heparan Sulfate Proteoglycans'. *Journal of Virology* 89 (7): 3846–58. <https://doi.org/10.1128/JVI.03647-14>.

Y

- Yamaga, Ardath K., and Jing-Hsiung Ou. 2002. 'Membrane Topology of the Hepatitis C Virus NS2 Protein'. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (36): 33228–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202304200>.

- Yao, N., P. Reichert, S. S. Taremi, W. W. Prorise, and P. C. Weber. 1999. 'Molecular Views of Viral Polyprotein Processing Revealed by the Crystal Structure of the Hepatitis C Virus Bifunctional Protease-Helicase'. *Structure (London, England: 1993)* 7 (11): 1353–63.
- Yarlott, Lydia, Eleanor Heald, and Daniel Forton. 2017. 'Hepatitis C Virus Infection, and Neurological and Psychiatric Disorders – A Review'. *Journal of Advanced Research* 8 (2): 139–48. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.09.005>.
- Yeung, L. T. F., T. To, S. M. King, and E. A. Roberts. 2007. 'Spontaneous Clearance of Childhood Hepatitis C Virus Infection'. *Journal of Viral Hepatitis* 14 (11): 797–805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2007.00873.x>.
- Yi, MinKyung, Yinghong Ma, Jeremy Yates, and Stanley 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000403>.

Z

- Zahid, Muhammad N., Marine Turek, Fei Xiao, Viet Loan Dao Thi, Maryse Guérin, Isabel Fofana, Philippe Bachellier, et al. 2013. 'The Postbinding Activity of Scavenger Receptor Class B Type I Mediates Initiation of Hepatitis C Virus Infection and Viral Dissemination'. *Hepatology* 57 (2): 492–504. <https://doi.org/10.1002/hep.26097>.
- Zeisel, Mirjam B., Daniel J. Felmlee, and Thomas F. Baumert. 2013. 'Hepatitis C Virus Entry'. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 369: 87–112. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_4.
- Zeuzem, Stefan, Pietro Andreone, Stanislas Pol, Eric Lawitz, Moises Diago, Stuart Roberts, Roberto Focaccia, et al. 2011. 'Telaprevir for Retreatment of HCV Infection'. *The New England Journal of Medicine* 364 (25): 2417–28. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1013086>.
- Zeuzem, Stefan, S. Victor Feinman, Jens Rasenack, E. Jenny Heathcote, Ming-Yang Lai, Edward Gane, John O'Grady, et al. 2009. 'Peginterferon Alfa-2a in Patients with Chronic Hepatitis C'. Research-article. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200012073432301>. 20 August 2009. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012073432301>.
- Zhang, Jie, Glenn Randall, Adrian Higginbottom, Peter Monk, Charles M. Rice, and Jane A. McKeating. 2004. 'CD81 Is Required for Hepatitis C Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection'. *Journal of Virology* 78 (3): 1448–55. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.3.1448-1455.2004>.
- Zhang, Jing, Osamu Yamada, Hiroshi Yoshida, Takahiro Iwai, and Hiromasa Araki. 2002. 'Autogenous Translational Inhibition of Core Protein: Implication for Switch from Translation to RNA Replication in Hepatitis C Virus'. *Virology* 293 (1): 141–50. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1270>.
- Zheng, Aihua, Fei Yuan, Yanqin Li, Fangfang Zhu, Pingping Hou, Jianqing Li, Xijun Song, Mingxiao Ding, and Hongkui Deng. 2007. 'Claudin-6 and Claudin-9 Function as Additional Coreceptors for Hepatitis C Virus'. *Journal of Virology* 81 (22): 12465–71. <https://doi.org/10.1128/JVI.01457-07>.
- Zhong, Jin, Pablo Gastaminza, Guofeng Cheng, Sharookh Kapadia, Takanobu Kato, Dennis R. Burton, Stefan F. Wieland, Susan L. Uprichard, Takaji Wakita, and Francis V. Chisari. 2005. 'Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (26): 9294–99. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503596102>.
- Zhou, Yue, and Hiroaki Sakurai. 2017. 'Emerging and Diverse Functions of the EphA2 Noncanonical Pathway in Cancer Progression'. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 40 (10): 1616–24. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00446>.
- Zhu, Haihong, Flossie Wong-Staal, Haekyung Lee, Andrew Syder, Jeffrey McKelvy, Robert T. Schooley, and David L. Wyles. 2012. 'Evaluation of ITX 5061, a Scavenger Receptor B1 Antagonist: Resistance Selection and Activity in Combination With Other Hepatitis C Virus

- Antivirals'. *The Journal of Infectious Diseases* 205 (4): 656–62. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir802>.
- Zignego, Anna Linda, Donatella Macchia, Monica Monti, Valérie Thiers, Marcello Mazzetti, Marco Foschi, Enrico Maggi, Sergio Romagnani, Paolo Gentilini, and Christian Bréchet. 1992. 'Infection of Peripheral Mononuclear Blood Cells by Hepatitis C Virus'. *Journal of Hepatology* 15 (3): 382–86. [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(92\)90073-X](https://doi.org/10.1016/0168-8278(92)90073-X).
- Zihni, Ceniz, Clare Mills, Karl Matter, and Maria S. Balda. 2016. 'Tight Junctions: From Simple Barriers to Multifunctional Molecular Gates'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (9): 564–80. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>.
- Zona, Laetitia, Joachim Lupberger, Nazha Sidahmed-Adrar, Christine Thumann, Helen J. Harris, Amy Barnes, Jonathan Florentin, et al. 2013. 'HRas Signal Transduction Promotes Hepatitis C Virus Cell Entry by Triggering Assembly of the Host Tetraspanin Receptor Complex'. *Cell Host & Microbe* 13 (3): 302–13. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.006>.
- Zou, Shimian, Kerri A. Dorsey, Edward P. Notari, Gregory A. Foster, David E. Krysztof, Fatemeh Musavi, Roger Y. Dodd, and Susan L. Stramer. 2010. 'Prevalence, Incidence, and Residual Risk of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections among United States Blood Donors since the Introduction of Nucleic Acid Testing'. *Transfusion* 50 (7): 1495–1504. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02622.x>.

Annexes 1

Bioengineering of hepatocellular carcinoma reporter cells using CRISPR/Cas9-based tagging of endogenous Claudin-1

Camille M.H. Clément^{1,2,3,4}, Cristina M. Dorobantu^{3,4,\$}, Maika S. Deffieu^{1,2}, Philippe Ronde^{4,5}, Thomas F. Baumert^{3,4,6}, Yves Mély^{4,5}, Nilda Vanesa Ayala-Nunez^{1,2,3,4}, Raphael Gaudin^{1,2,3,4*}.

¹ CNRS, IRIM Institut de Recherche en infectiologie de Montpellier, 34293 Montpellier, France

² Université de Montpellier, 34090 Montpellier, France

³ Inserm U1110 – Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques (IVH)

⁴ Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

⁵ CNRS UMR 7021, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Faculté de pharmacie, 67401 Illkirch, France.

⁶ Pole Hépato-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Institut Hospitalo-universitaire, 67000 Strasbourg, France

\$ Present addresses:

CD: Viroclinics Biosciences B.V., Rotterdam, The Netherlands

* Corresponding author:

Raphael Gaudin, PhD

Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM)

CNRS UMR9004

1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France

Phone: +33 4 34 35 94 78

Email: raphael.gaudin@irim.cnrs.fr

Running title: Endogenous CLDN1 tagging using CRISPR/Cas9

Keywords: Tight junction; Claudin; permeability; hepatocellular carcinoma; CLDN1



Bioengineering of hepatocellular carcinoma reporter cells using CRISPR/Cas9-based tagging of endogenous Claudin-1

Journal:	<i>Biology of the Cell</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Clément, Camille; IRIM, Montpellier, France Dorobantu, Cristina; INSERM Deffieu, Maika; IRIM, Montpellier, France Rondé, Philippe; CNRS, Faculté de Pharmacie Baumert, Thomas; INSERM Mély, Yves; CNRS, Faculté de Pharmacie Ayala-Nunez, Nilda Vanesa; IRIM, Montpellier, France gaudin, raphael; IRIM, Montpellier, France,
Keywords:	Cell adhesion, Disease, Fluorescence techniques, Liver/hepatocytes, Virology/viruses

SCHOLARONE™
Manuscripts

Bioengineering of hepatocellular carcinoma reporter cells using CRISPR/Cas9-based tagging of endogenous Claudin-1

Camille M.H. Clément^{1,2,3,4}, Cristina M. Dorobantu^{3,4,§}, Maika S. Deffieu^{1,2}, Philippe Ronde^{4,5}, Thomas F. Baumert^{3,4,6}, Yves Mély^{4,5}, Nilda Vanesa Ayala-Nunez^{1,2,3,4}, Raphael Gaudin^{1,2,3,4*}.

¹ CNRS, IRIM Institut de Recherche en infectiologie de Montpellier, 34293 Montpellier, France

² Université de Montpellier, 34090 Montpellier, France

³ Inserm U1110 – Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques (IVH)

⁴ Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

⁵ CNRS UMR 7021, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Faculté de pharmacie, 67401 Illkirch, France.

⁶ Pole Hépato-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Institut Hospitalo-universitaire, 67000 Strasbourg, France

§ Present addresses:

CD: Viroclinics Biosciences B.V., Rotterdam, The Netherlands

* Corresponding author:

Raphael Gaudin, PhD

Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM)

CNRS UMR9004

1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France

Phone: +33 4 34 35 94 78

Email: raphael.gaudin@irim.cnrs.fr

Running title: Endogenous CLDN1 tagging using CRISPR/Cas9

Keywords: Tight junction; Claudin; permeability; hepatocellular carcinoma; CLDN1

Abstract

Background Information. Claudin1 (CLDN1) is a four-span transmembrane protein localized at cell-cell tight junctions (TJs), playing an important role in epithelial impermeability and tissue homeostasis under physiological conditions. Moreover, CLDN1 expression is upregulated in several cancers, and the level of CLDN1 expression has been proposed as a prognostic marker of patient survival.

Results. Here, we generated and characterized a novel reporter cell line expressing endogenous fluorescent levels of CLDN-1, allowing dynamic monitoring of CLDN-1 expression levels. Specifically, a hepatocellular carcinoma Huh7.5.1 monoclonal cell line was bioengineered using CRISPR/Cas9 to endogenously express a fluorescent TagRFP-T protein fused at the N-terminus of the CLDN1 protein. The resulting TagRFP-CLDN1^{+/+} cell line showed similar CLDN1 protein localization, impermeability and diffusion compared to its wild-type counterpart. Surprisingly, the edited cells were resistant to hepatitis C virus (HCV) infection, of which CLDN1 is a viral receptor, while retaining permissiveness to VSV-G-decorated pseudoparticles. Nevertheless, the cells were proved useful to monitor CLDN1 protein expression dynamics at endogenous levels. Indeed, as a proof-of-concept, we found that treatment with anti-CLDN1 antibody, a strategy previously proposed for anti-cancer therapy, led to disrupted localization of CLDN1, providing insight regarding the mechanism of action of anti-CLDN1 antibodies.

Conclusions. The Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} edited cell line showed physiological features comparable to that of non-edited cells, but became resistant to HCV infection.

Significance. Although HCV-related studies could not be achieved with these cells, our work provides a novel tool to study the cell biology of tight-junction associated proteins and a potential screening platform for anticancer drug discovery.

Introduction

The Claudin family is composed of 24 members, exhibiting four transmembrane domains: a short amino terminal domain (2-6 residues), two extracellular loops and a C-terminal cytoplasmic tail (for review see (Anderson and Van Itallie, 2009)). Claudins favor cell-to-cell adhesion by homo- or heterotypic interactions with neighboring cells. They are also involved in the maintenance of epithelial/endothelial cell impermeability and confer the ion selectivity of TJs.

Claudin-1 (CLDN1) together with Claudin-2 (CLDN2), were the two first members of the Claudin family discovered (Furuse et al., 1998). CLDN1 knock-out in mice results in expected Mendelian ratios and the newborn animals were indistinguishable from wild-type littermate (Furuse et al., 2002). Although epidermis cytoarchitecture was normal, they died within a day with wrinkled skin, due to dehydration, suggesting that CLDN1 plays a crucial role in the epidermis' homeostasis.

CLDN1 has been particularly investigated in the context of cancer, in which it has been reported to be upregulated in most types of malignancy, including hepatocellular carcinoma, colorectal carcinoma, gastric adenocarcinoma, meningioma, ovarian epithelial carcinoma, pancreatic carcinoma, prostate carcinoma and renal cell carcinoma (Singh et al., 2010). Therefore, CLDN1 expression level has been proposed as a prognostic marker of patient survival in renal cell carcinomas (Fritzsche et al., 2008), although it is highly cancer-type dependent and inverse correlation may also exist (Pyo et al., 2019). CLDN1 plays also a role in the cell entry of the Hepatitis C virus (HCV) (Evans et al., 2007), while other entry factors are also required (Miao et al., 2017). Using constructs to overexpress tagged versions of CLDN1, it was proposed that CLDN1 interacts with CD81 (another HCV entry factor), favoring virus entry (Harris et al., 2010; Harris et al., 2008).

Given its important role in HCV entry, CLDN1 has been shown to be a target for antiviral therapy (Colpitts et al., 2018; Mailly et al., 2015). Furthermore, given the overexpression of CLDN1 in various cancers (Kwon, 2013; Zeisel et al., 2018), CLDN1 has been proposed as target for anti-cancer therapies (Cherradi et al., 2017). The molecular mechanisms involved in the tight regulation of the expression and distribution of Claudins have been well studied (Anderson and Van Itallie, 2009; Tsukita et al., 2019) but strategies to modulate them are still scarce. New tools such as reporter cell lines expressing endogenous levels of CLDN1 under the control of its physiological promoter and within its physiological genomic microenvironment may help to develop innovative therapeutic strategies.

The Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) has been widely used to surgically insert DNA sequences into the genome of mammalian cells, offering novel

1
2
3 tagging approaches in cell biology and cancer research (Davare and Tognon, 2015). Here we
4 present the first CRISPR/Cas9-engineered cell line, to our knowledge, in which an
5 endogenous TJ-associated protein was fully replaced by a fluorescently-tagged version of the
6 protein.
7
8
9

10 11 12 **Results**

13
14 The overexpression of CLDN1 is associated to increased cell proliferation, invasion and
15 migration and affects epithelial permeability in various cell lines (Zeisel et al., 2018). Therefore,
16 transient transfection of CLDN1 cDNA classically employed to express a tagged version of the
17 protein, may lead to artefacts associated to overexpression. Here, we designed a CRISPR-
18 based approach to generate cells expressing endogenous levels of fluorescently tagged
19 CLDN1. A sequence coding for the fluorescent TagRFP-T protein (Shaner et al., 2008) was
20 inserted at the start codon of the gene coding for CLDN1, followed by a GGSGGSGGS coding
21 sequence to flexibly link the TagRFP-T tag to CLDN1 (Figure 1).
22
23
24
25
26

27 The hepatocellular carcinoma cell line Huh7.5.1 was edited upon transfection with a plasmid
28 coding for the spCas9 protein, a DNA PCR product coding for a guide RNA (gRNA) targeting
29 the ATG region of the CLDN1 gene, and a TagRFP-T “donor” plasmid providing the DNA
30 template for homologous recombination as previously described (Chou et al., 2016; Ran et
31 al., 2013). Flow cytometry cell sorting of single cells provided monoclonal cell lines that were
32 screened by PCR on the extracted genomic DNA. We selected a monoclonal cell line
33 expressing the TagRFP-T tag on all alleles (TagRFP-CLDN1^{+/+}), as no endogenous band was
34 detected (Figure 2a). At the protein level, a band at ≈ 22 kDa, corresponding to the expected
35 size was detected for WT cells, while no band was observed at this size for TagRFP-CLDN1^{+/+}
36 cells (Figure 2b). Instead, a higher band at ≈ 49 kDa was observed, corresponding to the
37 expected size of the chimera fusion protein TagRFP-CLDN1. A lower faint band was also
38 observed in both cell types, which may correspond to a CLDN1 isoform. By flow cytometry, all
39 TagRFP-CLDN1^{+/+} cells show high fluorescence as compared to WT cells (Figure 2c). To
40 compare whether the edited cells express the same amount of CLDN1 as their wild-type
41 parental cell line, cells were stained with an anti-CLDN1 antibody and the mean fluorescence
42 intensity (MFI) was measured by flow cytometry. In parallel, GAPDH antibody staining was
43 performed to normalize the general protein expression level per cell. No difference was
44 observed between WT and edited cells (Figure 2d-e), indicating that the addition of TagRFP
45 to the CLDN1 protein did not change its expression level.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 Using confocal microscopy, we found that TagRFP-CLDN1 was distributed at TJs together
59 with Occludin (OCLN), another TJ-associated protein (Figure 3a). Moreover, the edited cells
60

1
2
3 were similarly polarized as WT cells as observed by the apical localization of the Ezrin staining
4 (Figure 3a). We noticed that the fluorescence of TagRFP-CLDN1 was relatively low in our
5 fixed samples, probably because of the fixation and staining procedures. In live edited cells,
6 we observed that the TagRFP-CLDN1 fluorescent signal was brighter, distributing at more
7 distinct TJ structures (Figure 3b).

8
9
10
11 To test whether the TagRFP-CLDN1^{+/+} edited cell line had functional features similar to those
12 of its WT counterpart, cells were grown for four days on a transwell insert harboring a
13 membrane with 0.4 μm pores (Figure 4a). The cell monolayers' relative permeability measured
14 by transepithelial electrical resistance (TEER) using a Voltohmmeter was similar for the WT
15 and edited cells (Figure 4b). As TEER may not be able to account for subtle differences, cells
16 grown as in Figure 4a were subjected to the fluorescent fluid phase marker Lucifer Yellow.
17 The amount of Lucifer yellow in the lower chamber, compared to the one retained in the upper
18 chamber was measured on a fluorometer and a permeability coefficient was calculated (see
19 Methods for details). As previously observed with TEER, the WT and edited cells did not
20 exhibit significant differences in permeability, while incubation with EDTA was lowering
21 epithelial impermeability in both cell lines (Figure 4c).

22
23
24 To determine whether TagRFP-CLDN1 retains its ability to diffuse at the TJ, live cell imaging
25 and fluorescent recovery after photobleaching (FRAP) experiments were undertaken (Figure
26 5a). Using a 3.36 μm FRAP region along TJs, the fluorescence recovery of the mobile fraction
27 was nearly total and the recovery half-time $T_{1/2}$ was ≈ 49 sec (Figure 5a-c). These values
28 indicate that CLDN1 is very mobile at TJs with relatively fast exchange rates, which diverges
29 from previously reported values (Shen et al., 2008).

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
CLDN1 is an entry factor required for successful infection of the Hepatitis C virus (HCV) and
the TagRFP-CLDN1^{+/+} edited cell line could be useful to study HCV-CLDN1 interactions. The
permissiveness of these cells to replication-competent recombinant HCV grown in cell culture
(HCVcc) expressing the Luciferase reporter was tested. Surprisingly, these cells became fully
resistant to the infection by HCVcc, while VSV-G pseudoparticles were not significantly
impacted by the editing (Figure 6).

CLDN1 was proposed to promote liver cancer (Suh et al., 2013), and CLDN1 antibody
targeting of has been suggested as a potential anti-cancer therapy (Cherradi et al., 2017).
Thus, we used our gene edited hepatocellular carcinoma Huh7.5.1 cells to monitor the
distribution of endogenous CLDN1 over time in the presence or absence of an anti-CLDN1
antibody (Figure 7). In control cells treated with irrelevant IgG, CLDN1 was mostly observed
at cell-cell junctions. In contrast, treatment with anti-CLDN1 antibody induces morphological
cell rearrangements as well as CLDN1 redistribution throughout the plasma membrane.

1
2
3 Together, these observations indicate that the TagRFP-CLDN1^{+/+} edited cell line could be
4 used as a screening platform for anticancer drug searches.
5
6
7
8

9 Discussion

10
11 Novel models to test for anti-cancer drugs are needed. Exploring diverse readouts is a
12 prerequisite given the heterogeneity of cancer types. Here, we propose to use CRISPR/Cas9
13 to monitor endogenous protein distribution and expression, with the example of CLDN1.
14
15

16 We generated a novel cell line and associated pipeline, which strategy could be easily
17 repurposed to monitor other pro-cancerous factors. Of note however, the editing efficiency
18 was low ($\approx 0.5\%$), which is common when one tries to insert large DNA fragments using
19 homologous recombination (HR). Improved CRISPR-based knock-in methods have been
20 released based on non-homologous end joining (NHEJ), which could further facilitate and
21 fasten this process (Sawatsubashi et al., 2018; Suzuki et al., 2016). Yet, the constraints
22 associated to the design of the adequate target sequence confer complexity to these novel
23 editing strategies.
24
25
26
27
28

29 Here, using antibody staining coupled to flow cytometry, we found that expression of CLDN1
30 was not impacted by endogenous tagging. Of note however, a decreased intensity of the
31 TagRFP-CLDN1 band was observed by western blot, compared to wild type CLDN1 (Figure
32 2b). We attributed this difference to the lower transfer efficiency of proteins with higher
33 molecular weight, precluding proper quantification of the protein expression levels. Indeed,
34 RT-qPCR and flow cytometry experiments confirmed that CLDN1 expression was not
35 impacted by the addition of the tag.
36
37
38
39
40
41

42 By microscopy, we observed that CLDN1 was mainly localized at TJs (Figure 3), as expected
43 for a Claudin family member. However, a subset of CLDN1 proteins was also observed outside
44 TJs, a distribution that is not so surprising, as Claudins also exert numerous “non-canonical”
45 functions (Hagen, 2017; Van Itallie and Anderson, 2013). Fixing cells with paraformaldehyde
46 (PFA) decreased the quality of the TagRFP-CLDN1 fluorescent signal. This observation could
47 be explained in part by the increased background induced by the PFA itself, or by an adverse
48 effect of one of the fixation reagents on the photophysics of the TagRFP-T protein.
49
50
51
52
53

54 The cytosolic N-terminal region of CLDN1 is predicted to be only 7 amino acid long and thus,
55 this position was previously used to tag the Claudin proteins (Harris et al., 2008; Shen et al.,
56 2008; Van Itallie et al., 2017). Yet, previous reports only used overexpressed proteins, and
57 endogenous CLDN1 remained. Here, by endogenously tagging CLDN1, we show that the N-
58 terminal labeling of the protein does not perturb cell impermeability (Figure 4). We found that
59
60

CLDN1 was highly mobile at TJs with fast fluorescence recovery rates compared to previously published data (Shen et al., 2008). These differences may be explained by the difference of cell line used: human hepatocellular carcinoma versus Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells; the tag: TagRFP-T versus EGFP; and the expression strategy: CRISPR versus transient overexpression. Thus, further work will be required to determine whether the mobility of CLDN1 is cell-type dependent and whether the tagging strategy impacts it.

CLDN1 plays a role in the cell entry of the Hepatitis C virus (HCV) (Evans et al., 2007), while other entry factors are also required (Miao et al., 2017). Using constructs to overexpress N-terminus tagging of CLDN1, it was proposed that CLDN1 interacts with CD81 (another HCV entry factor), favoring virus entry (Harris et al., 2010; Harris et al., 2008). Here, we found that the cells lost permissiveness for unknown reasons. A possibility is that the TagRFP protein is affecting the cytosolic interactions between CLDN1 and other HCV entry factors, such as CD81 and further work would be required to decipher the importance of these findings.

CLDN1 expression has been proposed for cancer prognosis (Fritzsche et al., 2008) and our work provides a novel approach to quantitatively assess it in live cells. Moreover, anti-CLDN1 antibodies have been proposed for colorectal cancer therapy and antiviral HCV treatment (Cherradi et al., 2017; Mailly et al., 2015), but their mode of action remains only partially understood. Here, the TagRFP-CLDN1 edited cells provide a powerful platform to study the anti-cancerous and antiviral properties of anti-CLDN1 antibodies. Furthermore, pharmacologic and genetic screens could also be setup using these cells to quickly and reliably assess CLDN1 expression and distribution in a dynamic manner.

Materials and Methods

Cell line

The hepatocellular carcinoma Huh7.5.1 cell line (Zhong et al., 2005) was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 4.5 g/L D-Glucose (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 1X MEM non-essential amino acids (Gibco), and 1X gentamicin (10 mg/mL; Gibco).

Antibodies

Rabbit anti-CLDN1 antibody was purchase from Elabscience and Proteintech. Mouse anti-GAPDH antibody [GT239] and Rabbit anti-Ezrin antibody were purchase form GenTex. Mouse anti-OCLN antibody and donkey anti-mouse/rabbit Alexa Fluor 488 and 647 were purchase from Thermofisher Scientific. Goat anti-mouse IgG antibody coupled to HRP and anti-rabbit IgG antibody coupled to HRP were purchase from Jackson ImmunoResearch. Mouse anti-

beta Actin antibody [AC-15] was purchase from Abcam. Rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 647 (isotype control) was purchase from R&D System.

Crispr/Cas9 knock-in

The “donor construct” used as template for the homologous recombination step was generated by fusion of two ~800-nucleotide fragments of genomic DNA upstream and downstream of the ATG start codon of CLDN1 and the open reading frame of TagRFP-T (see Figure 1). The primers used to generate these 3 fragments are described below (upper and lower cases indicate different targeting sequences):

F1 upstream CLDN1 ATG	5' – gaattcgagctcggtaccCGTGTGTGTGTAATCATGTTGCTCTC – 3'
R1 upstream CLDN1 ATG	5' – gactcgctcgggcgccc – 3'
F2 upstream CLDN1 ATG TagRFP	5' – ggcgccccgagcgagtcATGGTGTCTAAGGGCGAAGAGC – 3'
R2 TagRFP	5' – ggaaccaccagaaccaccagaacc – 3'
F3 linker downstream CLDN1 ATG	5' – ggtggttctggtggtcccTGCCAACGCGGGGCTGC – 3'
R3 downstream CLDN1 ATG	5' – gtcgactctagaggatccccGCAGCTTCTCCAAAGAGTCTTGC – 3'

The genomic fragments were obtained by two independent PCR amplifications using the genomic DNA (gDNA) of Huh7.5.1 cells extracted using the QuickExtract DNA extraction solution (Lucigen) as template and the F1-R1 and F3-R3 primers. The sequence coding for TagRFP-T followed by the GGS linker was amplified using the F2-R2 primers. The three PCR products were introduced into pUC19 vector by Gibson assembly (NEB) strategy and verified by DNA sequencing (Eurofins genomics).

The guide RNA of sequence 5' – gagcgagctatggccaacgc – 3' was designed using the crispr.mit.edu website. A PCR on a plasmid containing the U6 promotor with U6 forward primer 5' – acgggcccagatatacgcgtaaggtcgggagagagg – 3' and long reverse primer containing the gRNA and tracrRNA sequences was purchased as ultramer from IDTDNA and had the following sequence: 5' – acctctagaaaaaagcaccgactcgggtgccacttttcaagttgataacggactagccttatttaactgctatttctagctctaaacgcggtggccatgactcgcctccggtgttctgctcttccacaag – 3'. Electrophoresis of the PCR product was run on a 2% low melting agarose (Invitrogen) gel and purified using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions.

Huh7.5.1 cells were plated in 6-well plates to reach 70% confluence on the next day for transfection. Cells were co-transfected with 700 ng of each of the following DNA elements: the “donor” plasmid, the purified PCR product coding for the gRNA-tracrRNA, and a plasmid coding for *Streptococcus pyogenes* Cas9 (spCas9) using JetPrime (Polyplus Transfection) according to manufacturer's instructions. Upon recovery, cells were detached and seeded on

larger dishes according to their growth rate. At \approx 15-days post-transfection, cells were detached, resuspended in OptiMEM (Gibco) and filtered through a 40 μ m sterile cell strainer (BD Biosciences). Cells were sorted by fluorescence-activated cell sorting (FACS) using a FACS Aria 2 (BD Biosciences) instrument equipped with a 561 nm laser and a 130 μ m nozzle. An initially low number of cells (\sim 0.2%) showed a fluorescent signal above background and two subsequent sorts were required to obtain a pool of \sim 70% of fluorescent edited cells (Figure 2c). Generation of the monoclonal TagRFP-CLDN1^{+/+} cell line was obtained by limit dilution in 96-well plates and grown using filtered media from supernatant of Huh7.5.1 cell culture mixed at a 1:1 ratio with fresh complete media to stimulate the growth.

The gDNA of the monoclonal cell lines was extracted by QuickExtract DNA extraction solution (Lucigen). Identification of the double edited a TagRFP-CLDN1^{+/+} clone was performed by PCR amplification using GoTaq Polymerase (Promega) using primers F_{gCLDN1} 5' – cggagctgctttaaactcgcg – 3' and R_{gCLDN1} 5' – ctgggctggtcacgatgtg – 3' mapping a region around the start codon of *CLDN1*. The amplification of non-edited *CLDN1* corresponds to a 409-bp product, whereas the insertion of TagRFP results in a 1165-bp product.

Western blot

Wild-type and TagRFP-CLDN1^{+/+} Huh7.5.1 cells were lysed in RIPA Buffer (Sigma-Aldrich) for 20 min on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 10 000 g for 20 min at 4°C before transferring the supernatant to new tubes. The protein content in the lysates was measured using Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Twenty micrograms of each lysate were loaded on denaturing 4%-12% NuPAGE Bis-Tris protein gels (Invitrogen) and ran under non-reducing conditions. Transfer onto nitrocellulose membranes (Invitrogen) was achieved using a iBlot2 gel transfer device (Invitrogen). Membranes were blocked for 1 h at RT using 5% milk, 0.05% Tween20 in PBS (Genaxxon Bioscience) and subsequently incubated overnight at 4°C with primary antibody in 0.5% milk and 0.05% Tween20 in PBS. The membranes were extensively washed in 0.05% Tween20 in PBS and incubated for 2 h with a solution containing a secondary antibody coupled to the horseradish peroxidase (HRP). Membranes were revealed by chemiluminescence using Clarity Western ECL blotting substrates (Bio-Rad) and images were acquired using a ChemiDoc Touch system (Bio-Rad).

Flow cytometry

Cells detached with Trypsin-EDTA (Gibco) or with 10 mM EDTA (Invitrogen) for plasma membrane protein detection, were centrifuged at 450 g for 5 min at RT, washed once with PBS (Gibco) and fixed for 20 min at RT with 4% paraformaldehyde (PFA). Cells in suspension were incubated in blocking/permeabilization buffer (0.1% Triton X-100 and 0.5% BSA in PBS)

for 30 min at RT. Cells were incubated with primary antibodies at 4°C overnight, followed by washes and incubation with fluorophore-conjugated secondary antibodies diluted in blocking buffer for 45 min at RT. The percentage of positive cells and the mean fluorescence intensity (MFI) were determined by flow cytometry using a Novocyte cytometer (ACEA) and results were analyzed using FlowJo (LLC) v10.

Immunostaining and imaging of fixed samples

Cells were grown on 12 mm diameter #1.5 glass coverslips (Electron Microscopy Sciences) in 24-well plates for 48 h. Cells were fixed for 20 min at RT in 4% PFA. The coverslips were incubated in blocking/permeabilization buffer (0.5% BSA and 0.1% Triton X100 in PBS) for 30 min at RT and primary antibodies were then added for 2 h at RT. Upon washes, the coverslips were incubated with fluorophore-conjugated secondary antibodies diluted in blocking/permeabilization buffer for 45 min at RT. Dapi was added 5 min prior coverslip washing and mounting using Fluoromount aqueous mounting medium (Sigma-Aldrich). Image acquisition was performed using a Z1 inverted microscope (Nikon) mounted with a spinning disk head CSU-X1 (Andor), a EMCCD iXon897 camera (Andor) and a X100 Plan Apo lambda 1.45 NA oil objective (Nikon) controlled by the iQ3 software (Oxford instrument Andor). Images were analyzed with Imaris v.9.2 (Bitplane) or the Fiji version of ImageJ.

Live cell imaging

Cells were grown on 30 mm diameter #1.5 glass coverslip (Lordil) in 6-well plates for 48 h. Prior imaging, cells were incubated with Draq5 (Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions in Fluorobright media (Gibco) supplemented with 2% FBS (Sigma-Aldrich). Image acquisition was performed using an AxioObserver.Z1 inverted microscope (Zeiss) mounted with a spinning disc head (Yokogawa), a back-illuminated EMCCD camera (Evolve, Photometrics) and a X100, 1.45 NA oil objective (Zeiss) controlled by Visiview v.3.3.0 software (Visitron Systems).

FRAP

FRAP experiments were done on an iMIC videomicroscope (Till Photonics) equipped with a Cobolt Dual Calypso Laser 491/532 nm (Solna) and an Olympus 60x TIRFM (1.45 NA) oil objective. During acquisition, cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere using an environmental control system (Life Imaging Services). Images recorded before and after bleaching were acquired with a Spectra X light source on an ORCA-Flash 4 CMOS camera (Hamamatsu). A region of interest to be bleached of 3.36 μm was defined. After bleaching, images were acquired every 2.5 s to monitor the fluorescence recovery until 310 s.

Impermeability assays

Cells were cultured for 4 days on a 24-well transwell polyester membrane cell culture insert with 0.4 μm pores (Corning). TEER was measured using EVOM2 Epithelial Voltohmmeter (World precision instruments) and STX3 electrodes dipped into the upper and lower chambers of the transwell. The TEER values reported in Ω/cm^2 correspond to the transwell area multiplied by the measured resistance (Ω).

Permeability was assessed by adding 50 μM Lucifer yellow (Sigma-Aldrich) in the top chamber.

For the fluorescence-based permeability assay, cells grown in transwells were incubated with 50 μM Lucifer yellow reagent (Merck) for 2 h at 37°C and media were collected from the top and bottom chambers. Fluorescence quantification was performed using a Mithras LB 940 multimode microplate reader (Berthold Technologies) with 488 nm excitation and a 520 nm emission filter. In parallel, a calibration curve was prepared using Lucifer yellow concentrations of 50, 25, 12.5 or 6.25 μM . The permeability coefficient (P_c) was calculated as follows:

$$P_c = \frac{\text{Volume basal chamber}}{\text{Area transwell} \times \text{Initial concentration insert}} \times \frac{\text{Final concentration well}}{\text{Time}}$$

Virus production and titration

The HCVcc full length RNA was generated using the Megascript T7 transcription kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Huh7.5.1 cells were incubated with 5 μg of RNA diluted into Ingenio electroporation solution (Mirus) and electroporated using the T-001 program of the Amaxa nucleofector (Lonza). Viral supernatants were collected every 48 h after up to 6 passages after electroporation. The virus-containing supernatant was centrifuged at 1500 rpm 5 min to eliminate cell debris and the virus production was concentrated 6-10 times on Vivaspin20 centrifugal concentrators with 100 kDa cut-off (Sartorius) and stored at -80°C.

To produce VSV pseudoparticles, HEK 293T cells were seed in a 10 cm diameters petridish and transfected the day after using Calcium phosphate kit (Ozyme) with a vector coding for the retroviral Gag and Pol proteins, a vector coding for a Luciferase reporter protein inserted in between two LTR HIV sequences and a vector coding for the envelope glycoprotein of VSV (VSV-G).

The viruses were titrated on Huh7.5.1 cells infected for 72 hours at 37°C and 5% CO_2 . Cells were lysed using 50 μL Glo lysis buffer (Promega). Luciferase expression was measured using

the ONE-Glo luciferase assay system (Promega) in a 96-well flat bottom white plate (Corning) using the Infinite F200 Pro plate reader (Tecan).

Statistical analysis

Statistical analyses of the data were performed using two-tailed unequal variance Student t-tests (ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) and the mean and standard deviation of the mean were plotted using Prism. Number of independent experiments (n) is indicated in each figure legend.

Author contribution

C.M.H.C and C.M.D generated the CRISPR/Cas9 edited cell lines. C.M.H.C characterized the edited cell lines. N.V.A.N optimized the permeability assays. P.R and C.M.H.C performed and analyzed the FRAP. M.S.D performed live cell imaging. T.F.B and Y.M provided expertise and reagents. R.G designed and supervised the experiments and wrote the manuscript. All authors edited and commented on the manuscript.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the MRI imaging facility of advice and training. This work was supported by an ATIP-AVENIR starting grant to R.G. The salary of C.M.H.C was supported by INSERM and the Region Grand-Est. C.M.D was supported by an EMBO Long Term Fellowship (EMBO ALTF 1428-2016). The research leading to these results has received funding from the People Program (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under REA grant agreement n. PCOFUND-GA-2013-609102, through the PRESTIGE program coordinated by Campus France, and from the French Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS), both attributed to NVAN. Y.M. is grateful to the Institut Universitaire de France (IUF) for support and providing additional time to be dedicated to research. TFB is the recipient of an ERC AdG (HEPCIR grant agreement N° 667273).

References

Anderson, J.M., and Van Itallie, C.M. (2009). Physiology and function of the tight junction. Cold Spring Harbor perspectives in biology 1, a002584.

- Cherradi, S., Ayrolles-Torro, A., Vezzo-Vie, N., Gueguinou, N., Denis, V., Combes, E., Boissiere, F., Busson, M., Canterel-Thouennon, L., Mollevi, C., *et al.* (2017). Antibody targeting of claudin-1 as a potential colorectal cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res* 36, 89.
- Chou, Y.Y., Cuevas, C., Carocci, M., Stubbs, S.H., Ma, M., Cureton, D.K., Chao, L., Evesson, F., He, K., Yang, P.L., *et al.* (2016). Identification and characterization of a novel broad spectrum virus entry inhibitor. *Journal of virology*.
- Colpitts, C.C., Tawar, R.G., Maily, L., Thumann, C., Heydmann, L., Durand, S.C., Xiao, F., Robinet, E., Pessaux, P., Zeisel, M.B., *et al.* (2018). Humanisation of a claudin-1-specific monoclonal antibody for clinical prevention and cure of HCV infection without escape. *Gut* 67, 736-745.
- Davare, M.A., and Tognon, C.E. (2015). Detecting and targetting oncogenic fusion proteins in the genomic era. *Biol Cell* 107, 111-129.
- Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., and Rice, C.M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446, 801-805.
- Fritzsche, F.R., Oelrich, B., Johannsen, M., Kristiansen, I., Moch, H., Jung, K., and Kristiansen, G. (2008). Claudin-1 protein expression is a prognostic marker of patient survival in renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 14, 7035-7042.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of cell biology* 141, 1539-1550.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of cell biology* 156, 1099-1111.
- Hagen, S.J. (2017). Non-canonical functions of claudin proteins: Beyond the regulation of cell-cell adhesions. *Tissue Barriers* 5, e1327839.
- Harris, H.J., Davis, C., Mullins, J.G., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M.J., Mee, C.J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., *et al.* (2010). Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *The Journal of biological chemistry* 285, 21092-21102.
- Harris, H.J., Farquhar, M.J., Mee, C.J., Davis, C., Reynolds, G.M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S.G., *et al.* (2008). CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *Journal of virology* 82, 5007-5020.
- Kwon, M.J. (2013). Emerging roles of claudins in human cancer. *International journal of molecular sciences* 14, 18148-18180.
- Maily, L., Xiao, F., Lupberger, J., Wilson, G.K., Aubert, P., Duong, F.H., Calabrese, D., Leboeuf, C., Fofana, I., Thumann, C., *et al.* (2015). Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nature biotechnology* 33, 549-554.
- Miao, Z., Xie, Z., Miao, J., Ran, J., Feng, Y., and Xia, X. (2017). Regulated Entry of Hepatitis C Virus into Hepatocytes. *Viruses* 9.
- Pyo, J.S., Kim, N.Y., and Cho, W.J. (2019). Prognostic Role of Claudin-1 Immunohistochemistry in Malignant Solid Tumors: A Meta-Analysis. *J Pathol Transl Med* 53, 173-179.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* 8, 2281-2308.
- Sawatsubashi, S., Joko, Y., Fukumoto, S., Matsumoto, T., and Sugano, S.S. (2018). Development of versatile non-homologous end joining-based knock-in module for genome editing. *Scientific reports* 8, 593.
- Shaner, N.C., Lin, M.Z., McKeown, M.R., Steinbach, P.A., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W., and Tsien, R.Y. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature methods* 5, 545-551.
- Shen, L., Weber, C.R., and Turner, J.R. (2008). The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *The Journal of cell biology* 181, 683-695.
- Singh, A.B., Sharma, A., and Dhawan, P. (2010). Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol* 2010, 541957.
- Suh, Y., Yoon, C.H., Kim, R.K., Lim, E.J., Oh, Y.S., Hwang, S.G., An, S., Yoon, G., Gye, M.C., Yi, J.M., *et al.* (2013). Claudin-1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells. *Oncogene* 32, 4873-4882.

1
2
3 Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E.J., Hatanaka, F.,
4 Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., *et al.* (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated
5 homology-independent targeted integration. *Nature* 540, 144-149.

6 Tsukita, S., Tanaka, H., and Tamura, A. (2019). The Claudins: From Tight Junctions to Biological
7 Systems. *Trends Biochem Sci* 44, 141-152.

8 Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2013). Claudin interactions in and out of the tight junction.
9 *Tissue Barriers* 1, e25247.

10 Van Itallie, C.M., Tietgens, A.J., and Anderson, J.M. (2017). Visualizing the dynamic coupling of
11 claudin strands to the actin cytoskeleton through ZO-1. *Molecular biology of the cell* 28, 524-534.

12 Zeisel, M.B., Dhawan, P., and Baumert, T.F. (2018). Tight junction proteins in gastrointestinal and
13 liver disease. *Gut*.

14 Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard,
15 S.L., Wakita, T., and Chisari, F.V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of*
16 *the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9294-9299.

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

For Peer Review

Figure legends

Figure 1. Generation of Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} edited cells by CRISPR-Cas9 engineering. Scheme representing the strategy for the insertion of the TagRFP-linker sequence (red and yellow boxes) at the start codon of the *cldn1* gene using site-specific Crispr/Cas9 endonuclease.

Figure 2. Characterization of the monoclonal TagRFP-CLDN1^{+/+} edited cell line. (a) Genomic PCR analysis using the F_{gCDLN1} and R_{gCDLN1} primers (see red arrows shown in Figure 1). The non-edited *cldn1* gene (endogenous) is seen as a lower band, while the upper band corresponds to the TagRFP sequence inserted into the ATG region of *cldn1* (edited). (b) Western blot analysis of WT and edited cell lysate revealed with an anti-CLDN1 primary antibody and HRP-coupled secondary antibody. The non-edited CLDN1 protein (endogenous) is observed at ≈ 22 kDa in wild type cells. A band at predicted size of ≈ 49 kDa (edited) appears in the TagRFP-CLDN1 edited cells, while endogenous CLDN1 protein band is absent. A β -Actin antibody labeling was used as loading control. (c) The fluorescence of the TagRFP-CLDN1^{+/+} edited cells (red) was detected by flow cytometry using a 561 nm laser and compared to wild-type (grey) and a pool of edited cells (pink), containing a mix of edited and non-edited cells. (d-e) The absolute amount of CLDN1 protein expression level was measured using an anti-CLDN1 antibody revealed with a A488-coupled secondary antibody and analyzed by flow cytometry. (d) Representative dot plots showing the side-scatter channel as a function of the mean fluorescence intensity measured in the 488 nm laser excitation channel for wild-type (upper panels) or edited cells (lower channel). (e) The mean fluorescence intensity corresponding to the relative CLDN1 protein expressing level was normalized to the mean fluorescence intensity of the GAPDH protein and the mean \pm SD from 3 individual experiments show no difference between wild-type (grey) and edited cells (red). Two-tailed student t-test p value > 0.05 (non-significant; ns).

Figure 3. Distribution of TagRFP-CLDN1^{+/+} in edited cell lines. (a) Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} (cyan) cells and Huh7.5.1 wild-type cells were fixed, permeabilized and stained using Dapi (blue) and antibodies against OCLN (magenta) and Ezrin (orange). Images were obtained using 3D spinning disk confocal microscopy. The micrographs represent the XY view of a single Z plane and the lower panels correspond to an orthogonal YZ slice extracted at the pink dotted line. XY and YZ scale bar = 5 μ M. (b) Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} (cyan) cells were incubated with Draq5 staining solution to visualize the nucleus (blue) prior to live imaging using spinning disk confocal microscopy. The titled merge (right panel) correspond to the "Merge" with a $\approx 45^\circ$ titled view. Scale bar = 5 μ M.

Figure 4. Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} edited cells maintain normal impermeability properties. (a-c) WT or edited Huh7.5.1 cells were seeded on transwell inserts with 0.4 μ m pores for 4 days. (a) Scheme of the transwell system. (b) TEER measurement was performed using a Voltohmmeter. The bar graph corresponds to the mean \pm SD from three experiments performed in duplicate. Two-tailed p value was non-significant (ns) or < 0.001 (***). Edited cells and wild type present a similar TEER value. (c) The medium of the upper chamber in which the cells were grown was replaced by a medium containing 50 μ M Lucifer yellow and the permeability coefficient was assessed by measuring the Lucifer Yellow fluorescence intensity in the lower chamber 2 h post-incubation (see Methods for details). EDTA was used as a positive control. The bar graph corresponds to the mean \pm SD from three experiments performed in duplicate. Two-tailed p value was non-significant (ns) or < 0.01 (**) or < 0.001 (***). Both wild-type and edited cells present a low permeability coefficient.

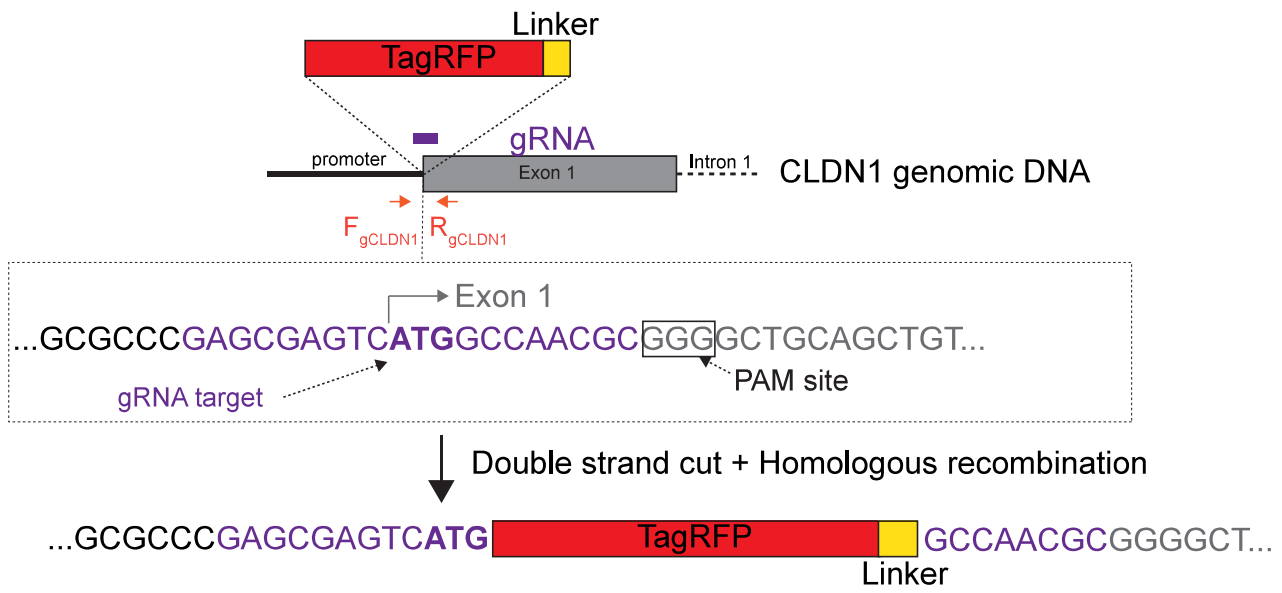
Figure 5. Relative diffusion of TagRFP-CLDN1 in edited cells. Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} cells were seeded on coverslips and imaged by videomicroscopy. A 3.36 μ m

1
2
3 diameter region along TJs was photobleached and fluorescence recovery after
4 photobleaching (FRAP) was measured. (a) Snapshots from a representative time-lapse
5 imaging of TagRFP-CLDN1 (cyan) performed before FRAP (0 s), right after FRAP (13 s) and
6 at indicated times post acquisition. Scale bar = 5 μ M. (b) The graph shows dependence of the
7 mean fluorescence intensity \pm SD over time normalized by the initial fluorescence from five
8 FRAP experiments. (c-d) Percentage of fluorescence recovery (c) and $T_{1/2}$ recovery (d) \pm SD
9 measured upon TagRFP-CLDN1 photobleaching were calculated from 40 FRAP experiments
10 acquired for 310 s each.
11
12

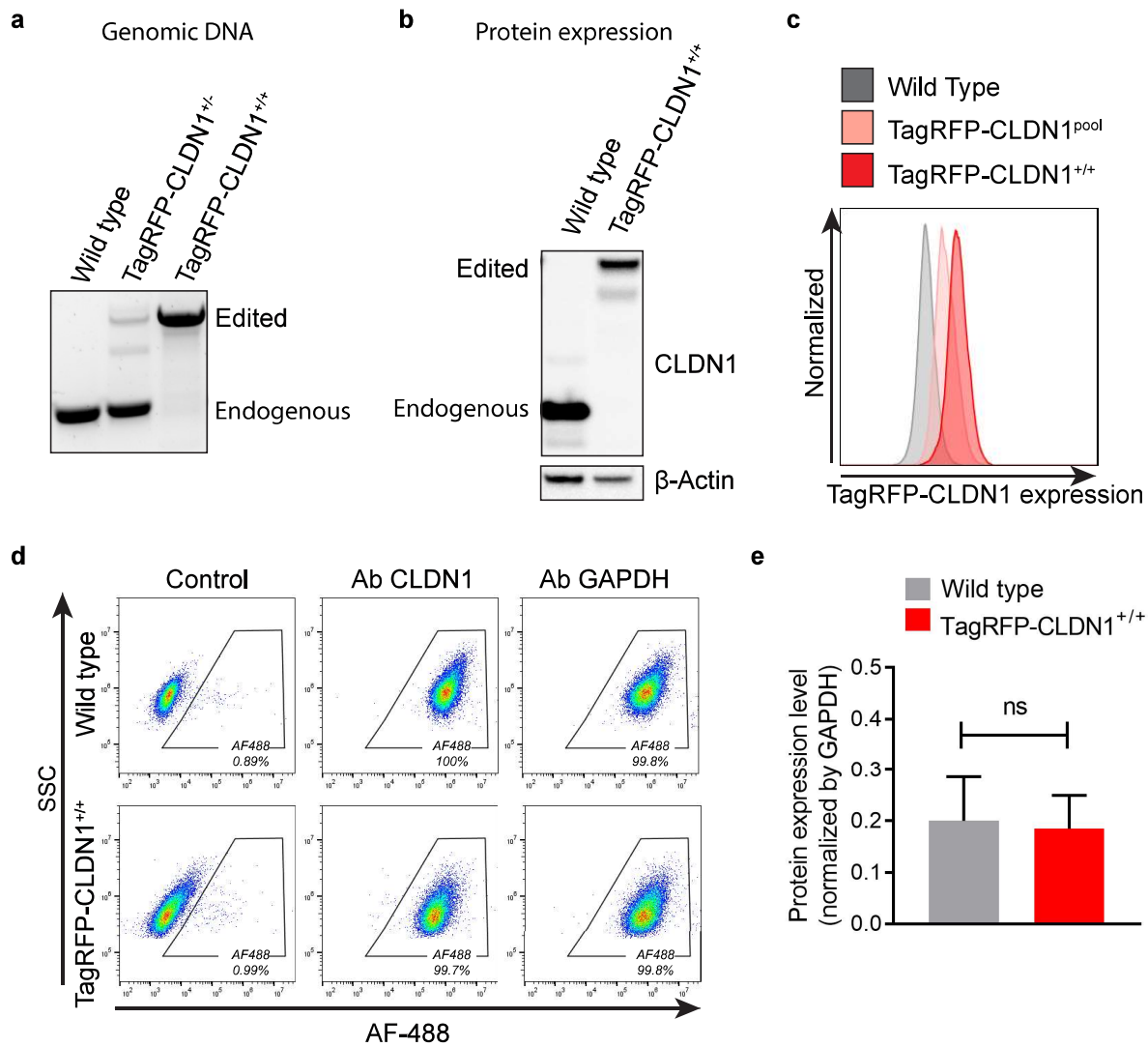
13 **Figure 6. Permissiveness of TagRFP-CLDN1^{+/+} edited cells to HCV.** Huh7.5.1 wild type
14 and TagRFP-CLDN1^{+/+} cells were inoculated with the luciferase reporter virus Jc1-Luc strain
15 (HCVcc) or VSV-G-decorated pseudoparticles (VSVpp). Luminescence was measured at 72h
16 post-infection. RLU: Relative luminometer units. The bar graph corresponds to the mean \pm
17 SD from three individual experiments performed in triplicates. Two-tailed p value was < 0.001
18 (***).
19

20 **Figure 7. Live cell imaging of TagRFP-CLDN1.** Huh7.5.1 TagRFP-CLDN1^{+/+} cells were
21 seeded on coverslips and treated with IgG control or polyclonal rabbit anti-CLDN1 antibody.
22 At 3 h post treatment (3 hpt), images were acquired by confocal microscopy every 30 min for
23 up to 10 h post treatment (10 hpt). The images show representative fluorescence signal of the
24 TagRFP-CLDN1 from the same field of view at 3 and 10 hpt. Images were acquired at the
25 same time and processed in the same way. Scale bar = 30 μ m.
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

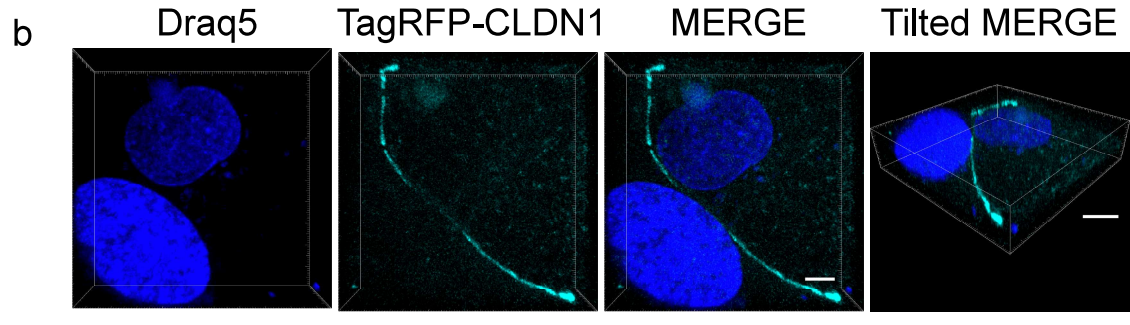
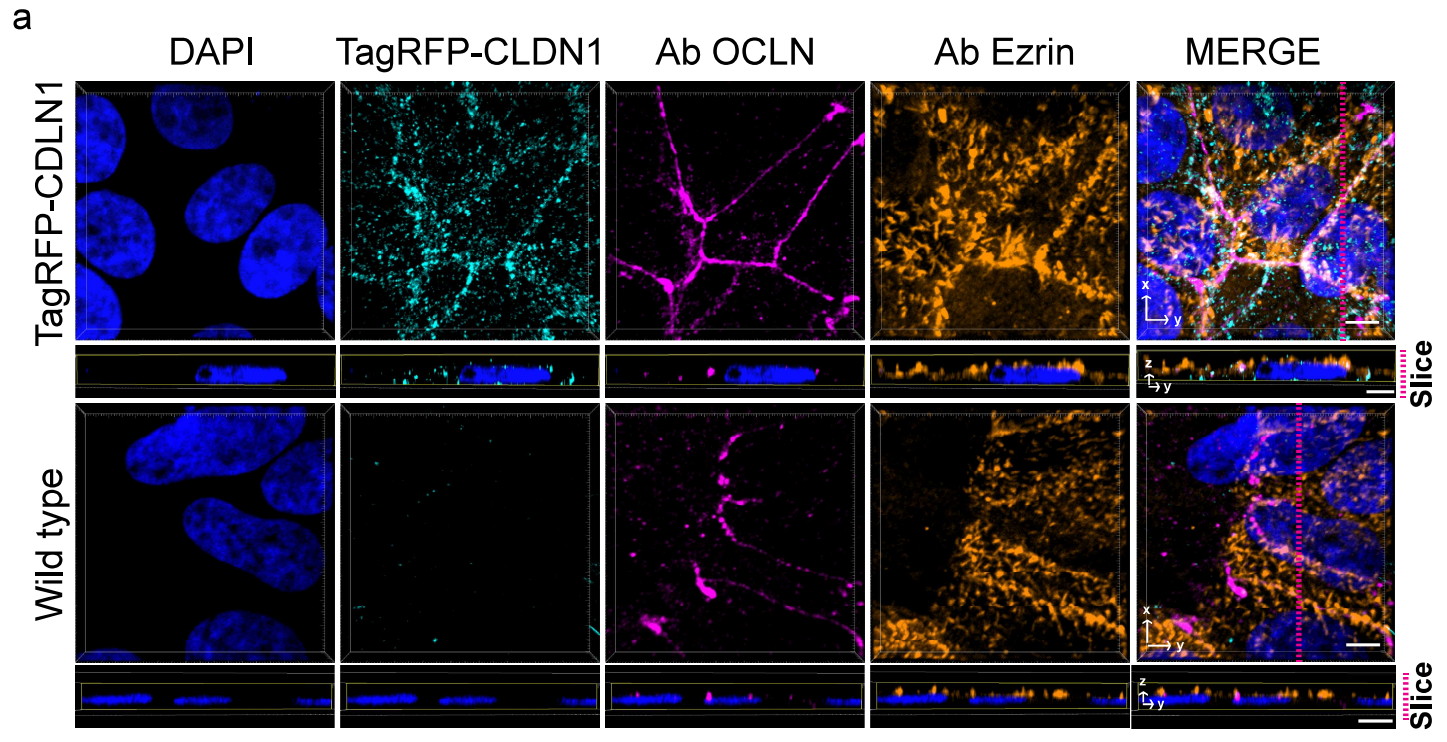
a



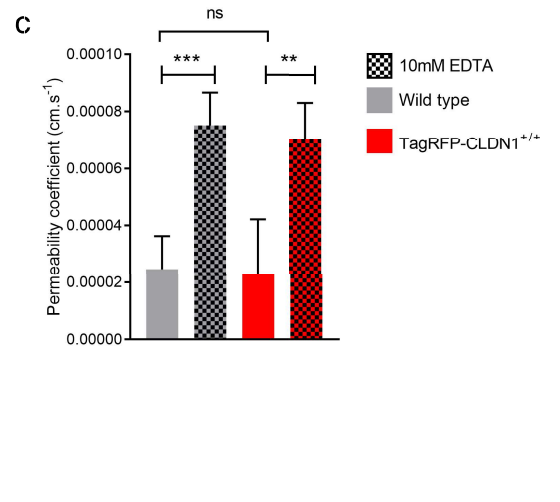
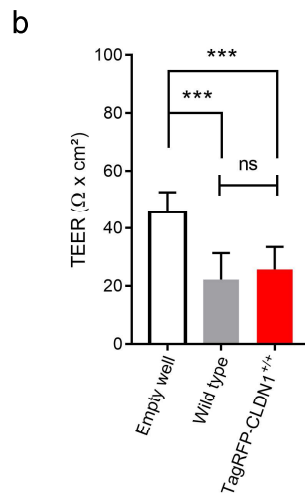
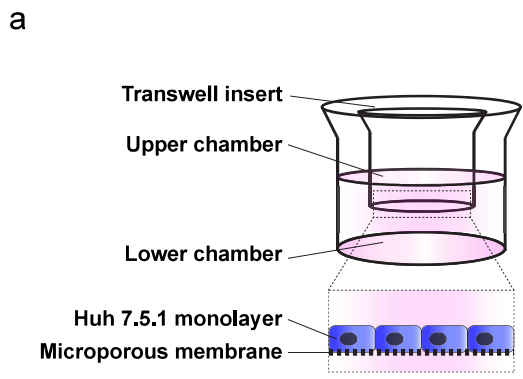
Clément et al. Figure 1



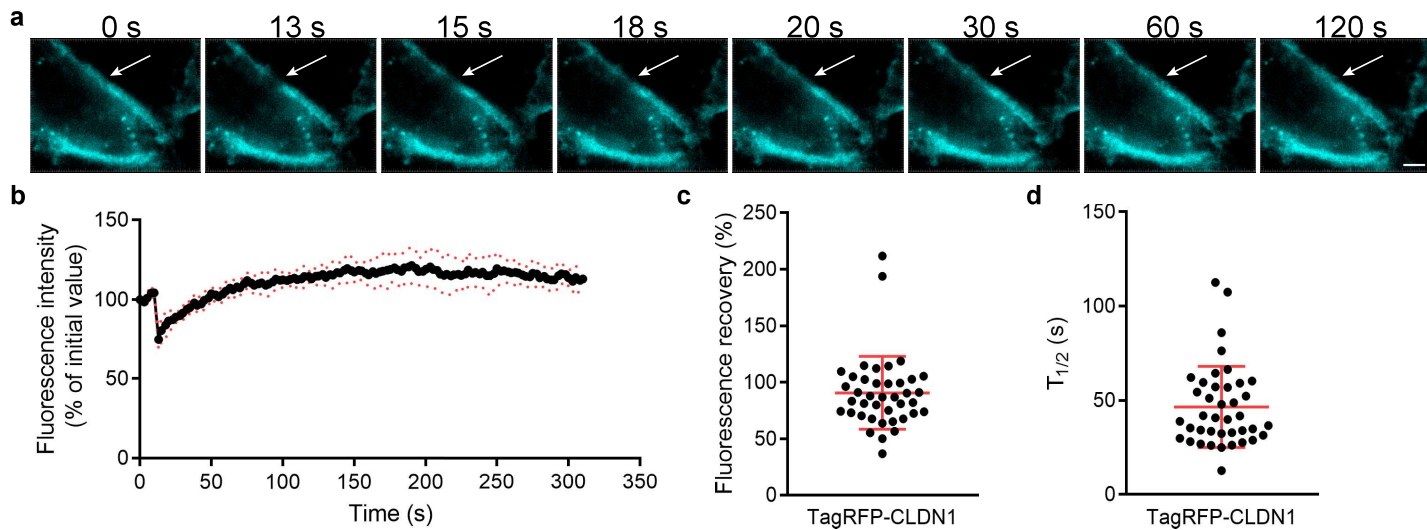
Clément et al. Figure 2



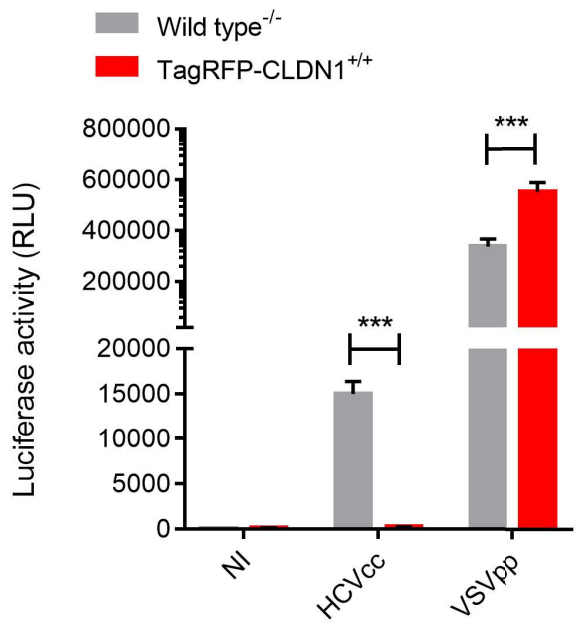
Clément et al. Figure 3



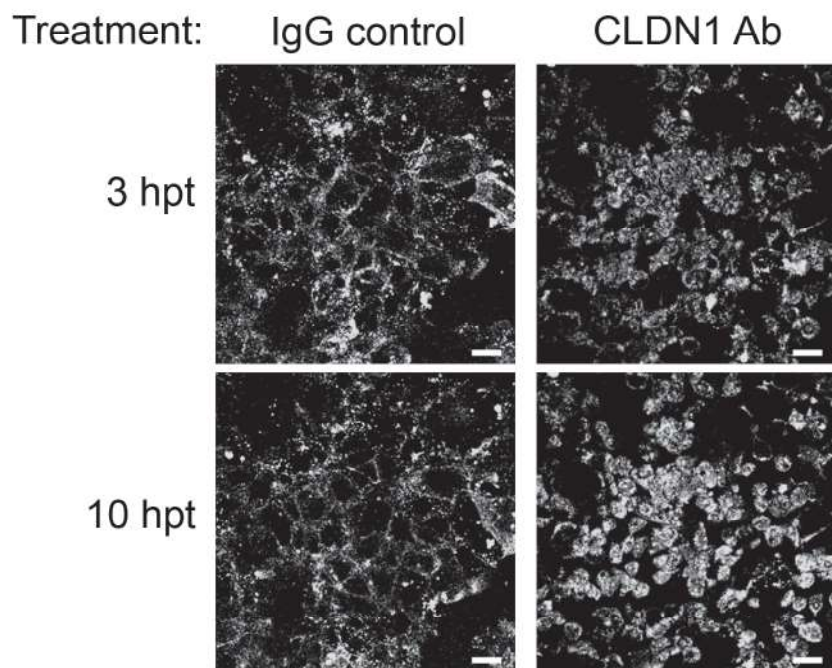
Clément et al. Figure 4



Clément et al. Figure 5



Clément et al. Figure 6



Clément et al. Figure 7

Annexes 2

Occludin recruitment decreases Hepatitis C virus particle dynamics outside tight junctions

Camille M.H Clément^{1,2,3}, Cristina M. Dorobantu^{3,4,\$}, Nilda Vanesa Ayala-Nunez^{1,2,3,4}, Philippe Rondé^{3,5}, Thomas F. Baumert^{3,4,6}, Yves Mély^{3,5}, Vincent Lucansky^{3,4,\$}, Raphael Gaudin^{1,2,3,4*}.

¹ Institut de Recherche en infectiologie de Montpellier (IRIM) CNRS, 34293 Montpellier, France

² Université de Montpellier, 34090 Montpellier, France

³ Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

⁴ INSERM, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, 67000 Strasbourg, France

⁵ UMR 7213 CNRS, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Faculté de pharmacie, 67401 Illkirch, France.

⁶ Pole Hépato-digestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Institut Hospitalo-universitaire, 67000 Strasbourg, France

\$ Present addresses:

CD: Viroclinics Biosciences B.V., Rotterdam, The Netherlands

VL: Biomedical Center Martin JFM CU, Division of Oncology, Mala Hora 4C, 036 01 Martin, Slovakia

* Corresponding author:

Raphael Gaudin, PhD

Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM)

CNRS UMR9004

1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France

Phone: +33 4 34 35 94 78

Email: raphael.gaudin@irim.cnrs.fr

Running title: Dynamics of HCV-Occludin association

Keywords: virus-host interactions; HCV entry; live cell imaging; CRISPR/Cas9; gene editing; virus internalization

Occludin slows down Hepatitis C virus particle dynamics outside the tight junctions

Camille M.H Clément^{1,2,3,4}, Cristina M. Dorobantu^{3,4,\$}, Nilda Vanesa Ayala-Nunez^{1,2,3,4}, Philippe Rondé^{3,5}, Thomas F. Baumert^{3,4,6}, Yves Mély^{3,5}, Vincent Lucansky^{3,4,\$}, Raphael Gaudin^{1,2,3,4*}.

¹ Institut de Recherche en infectiologie de Montpellier (IRIM) CNRS, 34293 Montpellier, France

² Université de Montpellier, 34090 Montpellier, France

³ Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

⁴ INSERM, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, 67000 Strasbourg, France

⁵ UMR 7213 CNRS, Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Faculté de pharmacie, 67401 Illkirch, France.

⁶ Pole Hépatodigestif, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Institut Hospitalo-universitaire, 67000 Strasbourg, France

^{\$} Present addresses:

CD: Viroclinics Biosciences B.V., Rotterdam, The Netherlands

VL: Comenius University in Bratislava, the Jessenius Faculty of Medicine in Martin (JFMED CU), Biomedical Center Martin, Mala Hora 4C, 036 01 Martin, Slovakia

* Corresponding author:

Raphael Gaudin, PhD
Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM)
CNRS UMR9004
1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France
Phone: +33 4 34 35 94 78
Email: raphael.gaudin@irim.cnrs.fr

Running title: Dynamics of HCV-Occludin interplay

Keywords: virus-host interactions; HCV entry; live cell imaging; CRISPR/Cas9; gene editing; virus internalization

35 Summary

36 The identification and characterization of the numerous hepatitis C virus (HCV) entry factors
37 were determinant for our current understanding of the virus' entry steps. However, information
38 regarding the spatiotemporal dynamics describing the specific role of each of these entry
39 factors early after the first virus-cell interactions is still limited. Specifically, how HCV particles
40 associate at the cell surface with Occludin (OCLN), a structural protein part of the tight junction
41 (TJ) complex at cell-cell contact, remains unclear. Here, we generated CRISPR/Cas9 gene
42 edited Huh7.5.1 cells expressing endogenous levels of OCLN fused to the enhanced green
43 fluorescent protein (EGFP) to follow the spatiotemporal dynamics of HCV-OCLN interactions.
44 Quantitative 5D image analyses revealed that endogenous OCLN is recruited outside TJs to
45 interact with incoming HCV particles. Moreover, the amount of OCLN beneath HCV particles
46 was correlated to lower motility of the particle, suggesting that recruitment of OCLN may serve
47 to immobilize the particle prior internalization. Together, the bioengineering of a HCV-
48 permissive cell line allowed us to uncover a mechanism by which the cellular protein OCLN is
49 recruited at the cell surface beneath HCV particles to favor viral infection.

50

51

52 Introduction

53 According to the world health organization, 71 million of the worldwide population was infected
54 by the hepatitis C virus (HCV) in 2015. HCV chronically infects hepatocytes and induces
55 hepatic lesions, which favors fibrosis, cirrhosis ultimately to hepatocarcinoma (HCC). HCC
56 represents one of the most aggressive cancers, with 700 000 deaths estimated in 2012 (1, 2).
57 Despite the recent introduction of a therapeutic treatment for HCV with an efficiency $\geq 90\%$
58 (2), diagnostic and prevention are still insufficient, cured patients are not protected against
59 HCV re-infected, and we lack data regarding long-term impact of the treatment. Indeed, pro-
60 carcinogenic hallmark persists in cured patients (3).

61 HCV is an enveloped positive-strand RNA virus from the *Flaviviridae* family. HCV particles
62 enter cells through clathrin-mediated endocytosis (4, 5) and numerous entry factors have been
63 reported to facilitate HCV attachment and internalization, including LDLR, CD81, SR-B1,
64 Claudin1 (CLDN1), Occludin (OCLN), EGFR and Eph2A (6-8). Although the functional role of
65 these entry factors has been investigated, little is known about the spatiotemporal dynamics
66 of HCV-receptor interactions.

67 Analyses of the temporal recruitment of the different HCV entry factors using blocking
68 antibodies in HepG2 cells (overexpressing CD81 and miR122), showed that CLDN1 and
69 OCLN are the last entry factors required prior to internalization and endosomal acidification
70 (9). CLDN1 and OCLN are two tight junction (TJ) associated proteins and thus, a “stick-and-
71 seek” strategy (10) – in which viral particles are first landing on the cell surface, and
72 subsequently sliding at the cell surface toward the TJs – was often used to represent how the
73 viral particle would reach out to its receptors (11).

74 An early spatiotemporal study performed in CD81-EGFP or GFP-Actin overexpressing Huh7.5
75 cells, failed at demonstrating the directed movement of HCV particles toward TJs (5), as
76 opposed to the Coxsackie virus, for which clear redistribution of incoming virions toward TJs
77 was demonstrated (12). These studies were performed in cell culture monolayers and more
78 recently, it was shown that HCV particles incubated with Huh7.5 cells grown in 3D, were
79 distributed at the center of the spheroid, colocalizing with TJ markers (13), although it was
80 recently shown that TJ localization of the viral receptor OCLN is not a prerequisite for HCV
81 infection (14).

82 Here, we generated a HCV-permissive Huh7.5.1 cell line expressing a fluorescent OCLN
83 protein at endogenous levels and under the control of its natural genomic environment using
84 CRISPR/Cas9 knock-in. We found that HCV virions recruit OCLN outside TJs, which promotes
85 viral particle stabilization.

86

87 **Results**

88 *Generation of Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} edited cells*

89 We first aimed at obtaining a HCV permissive cell line expressing endogenous levels of
90 fluorescent OCLN proteins. The genome of Huh7.5.1 cells was edited using a CRISPR/Cas9
91 knock-in approach as previously described (15, 16). Briefly, cells were transfected with a
92 plasmid coding for the spCas9 protein, a DNA PCR product coding for a guide RNA (gRNA)
93 targeting the ATG region of the *ocln* gene, and an EGFP “donor” plasmid providing the DNA
94 template for homologous recombination (see Fig. 1A and Material & Methods for details).
95 Upon sorting and clonal cell selection, a monoclonal Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} cell line showed
96 the EGFP sequence inserted on both alleles in the start codon region of the *ocln* gene (Fig.
97 1B). At the protein level, a band at 87 kDa, the expected size of EGFP-OCLN, was observed,
98 and no endogenous OCLN remained (Fig. 1C). The EGFP-OCLN band observed in the edited
99 cells was weaker than the endogenous OCLN in wild-type cells. Western blot quantification of
100 proteins of different molecular weight (MW) is not optimal, as the membrane transfer is less
101 efficient for higher MW proteins. Therefore, the amount of OCLN protein expressed by wild
102 type or EGFP-OCLN^{+/+} Huh7.5.1 cells was measured by flow cytometry using an anti-OCLN
103 antibody normalized by the amount of GAPDH protein (Fig. 1D). As a control, the expression
104 level of the TJ-associated protein ZO-1, which interacts with the cytosolic tail of OCLN, was
105 also analyzed. Both OCLN and ZO-1 proteins were expressed at similar levels in wild-type
106 and edited cells (Fig. 1D). Similarly, we could not detect significant differences at the mRNA
107 level for OCLN, nor for the other HCV entry factors CLDN1, CD81, and SR-B1 (Fig. 1E).

108 Together, these results show that we successfully added an EGFP in N-terminus of the OCLN
109 protein, at endogenous expression levels and no “ghost” non-fluorescent OCLN remained,
110 two features usually missing when using classic transient transfection.

111

112 *Functional characterization of Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} edited cells*

113 Next, we tested whether the EGFP-OCLN protein retained its correct distribution at TJs and
114 functional features. The relative permeability of the wild-type or edited cells was measured
115 using a transwell system (Fig. 2A) by assessing the transepithelial electrical resistance (TEER)
116 using a Voltohmmeter (Fig. 2B) and the permeability coefficient (Fig. 2C). In both assays, the
117 wild type or EGFP-OCLN^{+/+} edited cells did not show significant differences, indicating that the
118 addition of the EGFP tag does not affect the OCLN’s impermeability function. As a control
119 EDTA treatment was impairing the permeability coefficient of both cell lines (Fig. 2C).

120 At the subcellular level, EGFP-OCLN localization was found at TJ cell-cell contact sites,
121 colocalizing with an anti-OCLN antibody staining (Suppl Fig. S1A), indicating that the EGFP
122 signal correlates with actual OCLN proteins. The wild-type and edited cells exhibited polarized
123 features as shown by the staining of the apical marker Ezrin and the upper localization of ZO-
124 1 (Fig. 2D). The plasma membrane staining of the edited cells using a mCherry-CaaX
125 construct further highlighted the apical-basolateral polarization of the Huh7.5.1 cells (Suppl
126 Fig. S1B). Of note, in both cell lines, the cells were mostly polarized but patches of non-
127 polarized cells were also observed at lower frequency.

128 To assess whether the relative diffusion of EGFP-OCLN was preserved, fluorescence
129 recovery after photobleaching (FRAP) was performed. We observed that the endogenous
130 EGFP-OCLN proteins were mobile at TJ sites of Huh7.5.1 cells (Suppl Fig. S2A-D), in a similar
131 fashion to what was observed in MDCK cells under conditions where EGFP-OCLN was
132 overexpressed (17).

133 Finally, we tested whether the Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} cells were as permissive as wild type
134 cells using Jc1-Luc (HCVcc) or VSV-G-expressing pseudoparticles (VSVpp; Fig. 2E-F). We
135 observed a slight decrease of permissiveness of the edited cells compared to their wild-type
136 counterpart for both HCVcc and VSVpp. As VSV is not known to enter in a OCLN-dependent
137 manner, the luciferase activity obtained from HCVcc was normalized by the signal obtained
138 from VSVpp (Fig. 2F). In this case, no difference was observed between wild type and EGFP-
139 OCLN edited cells, suggesting that the labeling of OCLN is likely not perturbing its function as
140 a HCV entry factor.

141

142 *HCV-OCLN association occurs out of tight junctions*

143 To track HCVcc viral particles in fixed and live samples, we developed a purification and
144 labeling method (see Methods and Suppl Fig. S3A) based on the recombinant HCVcc Jc1^{FLAG-}
145 E² previously published (18). Our approach relies on the coupling of the affinity-purified HCVcc
146 particles to an Alexa Fluor 647 dye (A647) through a N-hydroxysuccinimidyl-ester reaction.
147 Non-labeled and A647-labeled HCVcc particles showed similar infectiveness (Suppl Fig.
148 S2B), indicating that the fluorescent dye does not perturb HCV infection.

149 To determine the localization of HCV particles upon virus-host interactions, kinetic analyses
150 of HCVcc-A647 distribution onto EGFP-OCLN^{+/+} edited cells was performed by confocal
151 microscopy (Fig. 3). Virus particles were mostly observed away from OCLN-positive TJs (Fig.
152 3A). Interestingly, we could detect OCLN signal outside of TJs, colocalizing with HCV particles
153 (Fig. 3A, virion 2). To obtain quantitative information, the viral particle signal was segmented,

154 excluding aggregates, and the presence or absence of OCLN colocalizing with the virus was
155 automatically assessed. The OCLN-positive HCV particles, were further classified into two
156 categories: “at TJs” or “out of TJs”. Strikingly, the vast majority of the HCV-OCLN association
157 events occurred out of TJs (Fig. 3B-C). Moreover, we observed a peak of colocalization
158 around 3 hpi that decreases later on. Infectious HCV particles requires about 3-4h to be
159 internalized (Suppl Fig. S4) and therefore, the timing of maximum HCV-OCLN association
160 correlates with the infectivity assays performed.

161 To gain more insights onto the virus’ spatiotemporal dynamics, we next performed live cell
162 imaging of EGFP-OCLN^{+/+} cells incubated for 3 h with HCVcc-A647 using a spinning confocal
163 microscope (Fig. 4A and Movie S1). Single particle tracking of the HCVcc-A647 from the upper
164 plans (surface of the cell) revealed that the virus was not directed nor moving toward TJs,
165 indicating that virus sliding is unlikely to represent a *bona fide* HCV entry model in our model.
166 Moreover, we could track the apparent internalization of OCLN-positive HCV particles out of
167 TJs (Fig. 4A, right panels). Unfortunately, these events were too rare or too difficult to reliably
168 detect to be quantified.

169

170 *HCV-OCLN association decreases mobility*

171 Next, we investigated the dynamic properties of single viral particles according to their relative
172 amount of associated OCLN. Spatiotemporal tracking of single particles highlighted that the
173 gain of OCLN beneath HCV particles was associated to lower mobility of the complex (Fig. 4B
174 and Movie S2). Automated quantification of the HCV particle speed and its associated OCLN
175 intensity was performed and a significant inversed correlation was observed between the
176 speed of HCV particles and the OCLN fluorescence intensity (Fig. 4C). These results show
177 that OCLN recruitment may stabilize the virion at the plasma membrane, which could favor
178 internalization.

179

180 **Discussion**

181 In this study, we investigated the spatiotemporal dynamics of HCV in association with one of
182 its main entry factor: OCLN. To this end, we generated a novel CRISPR/Cas9 bioengineered
183 Huh7.5.1 cell line expressing endogenous levels of fluorescent OCLN and performed high-
184 resolution 3D live cell imaging. Our observations indicated that the virions were not traveling
185 toward the TJs of a 2D monolayer, and in contrast, OCLN was found outside TJs at the plasma
186 membrane, beneath the virus, which was important for HCV stabilization.

187 Live cell imaging of viral receptor is difficult to perform because the fluorescent tagging of the
188 receptor is usually performed by cDNA transfection, therefore inducing overexpression of the
189 receptor and the reminiscence of non-tagged, endogenous receptor. In the case of OCLN,
190 transient transfection of its cDNA causes OCLN mislocalization (19), and thus, this approach
191 is not suited for the study of HCV entry. Here, we took advantage of the CRISPR/Cas9
192 technique (16) to insert a fluorescent tag within the genome of the permissive Huh7.5.1 cells
193 as we previously did in other cell lines (20, 21). Our extensive characterization of these cells
194 showed that they retained similar features as their parental non-edited lineage, including
195 permissiveness to HCVcc infection. Of note, we tagged in parallel the CLDN1 protein using
196 the same CRISPR-based approach, and the cells became fully resistant to the infection
197 (manuscript submitted). Together, the Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} cells represent a functional
198 tool to interrogate for OCLN distribution over time as well as a reporter cell line for OCLN
199 expression level variation.

200 Our assay showed that HCV was not sliding toward TJs, and surprisingly, we found that
201 instead, OCLN was recruited outside TJs to meet with the virus. Consistently with our findings,
202 recent work by Lavie *et al.* found that TJ localization of OCLN is not a prerequisite for HCV
203 infection in polarized hepatocytes (14). At this stage, we do not know how HCV capture the
204 OCLN proteins, and one could assume that low amount of OCLN proteins diffusing at the
205 plasma membrane may be captured by the complex formed by HCV with upstream entry
206 factors following models previously proposed for other viruses (10). This could well explain
207 why HCV virions take a relatively long time to get internalized (3-4 h; Fig. S4).

208 The main drawback of our model resides in the fact that the cells are grown as 2D monolayers,
209 therefore exposing their apical side to the virus, a topology that is opposed to physiological
210 conditions where hepatocytes expose their basolateral side to the bloodstream where the virus
211 come from. Recently, a group grew Huh7.5 cells in 3D, leading to the exposition of the
212 basolateral side of the cells (13). They proposed that in this context, HCV virions tend to slide
213 to the center of the cell mass where OCLN and other TJ-associated proteins were found, but
214 no direct imaging of the dynamics of HCV-receptor interactions was performed. As nano-
215 objects tend to naturally move toward the center of organoids due to a treadmilling effect (22),
216 we believe that both 2D and 3D models remain complementary to deepen our understanding
217 of HCV-receptor interactions. Actually, beyond the location where HCV and OCLN meet (at
218 TJ or outside TJs), our approach also allowed us to determine a role for OCLN as a potential
219 stabilizer of the HCV particles at the plasma membrane, which in turn would favor virus
220 internalization and infection. Further work will be required to identify the molecular determinant
221 responsible for OCLN-dependent virus immobilization.

222

223 **Materials and Methods**224 *Cell line*

225 Human embryo kidney cells 293T (Hek 293T; ATCC) and cells were cultured in Dulbecco's
 226 Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 4.5g/L D-Glucose supplemented with 10% fetal
 227 bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich), 1X Penicillin and streptomycin 5 000 U/mL (Gibco). The
 228 hepatocellular carcinoma Huh7.5.1 cells (23) were cultured in DMEM containing 4.5 g/L D-
 229 Glucose (Gibco) and 10% FBS (Sigma-Aldrich), 1X MEM non-essential amino acids (Gibco),
 230 and 1X gentamicin (10 mg/mL; Gibco).

231 *Antibodies*

232 Mouse anti-ZO1 was purchased from BD Biosciences. Mouse anti-GAPDH antibody [GT239]
 233 and Rabbit anti-Ezrin antibody were purchase form GenTex. Mouse anti-OCN antibody and
 234 donkey anti-mouse/rabbit Alexa Fluor 488 and 647 were purchase from Thermofisher
 235 Scientific. Goat anti-mouse IgG antibody coupled to HRP and anti-rabbit IgG antibody coupled
 236 to HRP were purchase from Jackson ImmunoResearch. Mouse anti-beta Actin antibody [AC-
 237 15] was purchase from Abcam. Monoclonal mouse antibody anti-NS5a was purchased from
 238 Virosat.

239 *CRISPR/Cas9 knock-in*

240 Gene editing was undertaken upon transfection of three DNA products followed by monoclonal
 241 cell selection as follow:

242 The "donor construct" used as template for the homologous recombination step was generated
 243 by fusion of two ~800-nucleotide fragments of genomic DNA upstream and downstream of
 244 the ATG start codon of OCLN and the open reading frame of EGFP (see Figure 1A). The
 245 primers used to generate these 3 fragments are described below (upper and lower cases
 246 indicate different targeting sequences):

F1 upstream OCLN ATG	5' – gaattcgagctcgggtaccCCATGCTCCCACTTCACTGTTC – 3'
R1 upstream OCLN ATG	5' – ggctgattgtcaatggtcagctg – 3'
F2 upstream OCLN ATG EGFP	5' – cagctgaccattgacaatcagccATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG – 3'
R2 Linker	5' – ggaaccaccagaaccaccagaacc – 3'
F3 linker downstream OCLN ATG	5' – ggtctggtggtctctggtggtccTCATCCAGGCCTCTTAAAAGTCC – 3'
R3 downstream OCLN ATG	5' – gtcgacttagaggatccccGTCTTAAACTCCCGACCTCAGG – 3'

247

248 The genomic fragments were obtained by two independent PCR amplifications from the
 249 genomic DNA of Huh7.5.1 cells extracted using the QuickExtract DNA extraction solution

250 (Lucigen) as template and the F1-R1 and F3-R3 primers. The sequence coding for EGFP
251 followed by the GGS linker was amplified using the F2-R2 primers. The three PCR products
252 were introduced into pUC19 vector by Gibson assembly (NEB) strategy and verified by DNA
253 sequencing (Eurofins genomics).

254 The guide RNA of sequence 5' – ggatgacatggctgattgtc – 3' was designed using the
255 crispr.mit.edu website. A PCR on a plasmid containing the U6 promotor with U6 forward primer
256 5' – acgggccagatatacgcgtaaggtcgggcaggaagaggg – 3' and long reverse primer containing the
257 gRNA and tracrRNA sequences was purchased as ultramer from IDTDNA and had the
258 following sequence: 5' –

259 acctctagaaaaaagcaccgactcgggtgccacttttcaagttgataacggactagccttatttaactgctatttctagctctaaa
260 acgcgttggccatgactcgcctccggtgtttcgtcctttccacaag – 3'. Electrophoresis of the PCR product was
261 run on a 2% low melting agarose (Invitrogen) gel and purified using NucleoSpin Gel and
262 PCR Clean-up (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions.

263 Huh7.5.1 cells in 6-well plates were co-transfected with 700 ng of each of the following DNA
264 elements: the "donor" plasmid, the U6-gRNA-tracrRNA-coding PCR product, and a plasmid
265 coding for *Streptococcus pyogenes* Cas9 (spCas9) using JetPrime (Polyplus Transfection).
266 After 2-5 days, cells were detached and seeded on larger dishes according to their growth
267 rate. At \approx 15-days post-transfection, cells were detached, resuspended in OptiMEM (Gibco)
268 and filtered through a 40 μ m sterile cell strainer (BD Biosciences). Cells were sorted by using
269 a FACSAria 2 (BD Biosciences) cell sorter equipped with a 488 nm laser and a 130 μ m nozzle.
270 A marginal number of cells showed a fluorescent signal above background and three
271 subsequent sorts were required to obtain a pool of \sim 50% of fluorescent edited cells. The
272 monoclonal EGFP-*OCN*^{+/+} cell line was obtained by limit dilution in 96-well plates and grown
273 using a 1:1 ratio fresh/condition complete media to stimulate the growth.

274 The genomic DNA of the Huh7.5.1 cells was extracted by QuickExtract DNA extraction
275 solution (Lucigen). Identification of the edited EGFP-*OCN*^{+/+} clone was performed by PCR
276 amplification using GoTaq Polymerase (Promega) and primers F_{gOCN} 5' –
277 gctaaaggcattgctcatcct – 3' and R_{gOCN} 5' – aggtgacagcagttgtcctagc – 3' mapping a region
278 around the start codon of *OCN*. The amplification of non-edited *OCN* corresponds to a 310–
279 bp product, whereas the insertion of EGFP results in a 1054-bp product.

280 *Western blot*

281 Wild-type and EGFP-*OCN*^{+/+} Huh7.5.1 cells were lysed in RIPA Buffer (Sigma-Aldrich) for 20
282 min on ice. Lysates were cleared by centrifugation at 10 000 g for 20 min at 4°C and the
283 protein content in the lysates was measured using Pierce BCA protein assay kit (Life
284 Technologies). Twenty micrograms of each lysate were loaded on denaturing 4%-12%
285 NuPAGE Bis-Tris protein gels (Life Technologies) and ran under non-reducing conditions.

286 Transfer onto nitrocellulose membranes (Life Technologies) was performed using a iBlot2 gel
 287 transfer device (Life Technologies). Membranes were blocked for 1 h at RT using 5% milk,
 288 0.05% Tween20 in PBS (Genaxxon Bioscience) and then incubated overnight at 4°C with
 289 primary antibody in 0.5% milk and 0.05% Tween20 in PBS. The membranes were extensively
 290 washed in 0.05% Tween20 in PBS and incubated for additional 2 h with a solution containing
 291 a secondary antibody coupled to the horseradish peroxidase (HRP). Membranes were
 292 revealed by chemiluminescence using Clarity Western ECL blotting substrates (Bio-Rad) and
 293 images were acquired using a ChemiDoc Touch system (Bio-Rad).

294 *Flow cytometry*

295 Cells detached with Trypsin-EDTA (Gibco) or with 10 mM EDTA (Invitrogen) for plasma
 296 membrane protein detection, were centrifuged at 450 g for 5 min at RT, washed with PBS
 297 (Gibco) and fixed for 20 min at RT with 4% PFA. Cells in suspension were incubated in 0.1%
 298 Triton X-100 and 0.5% BSA in PBS for 30 min at RT for blocking/permeabilization. Cells were
 299 incubated with primary antibodies at RT for 2 h, followed by washes and incubation with
 300 fluorophore-conjugated secondary antibodies for 1 h at RT. The percentage of positive cells
 301 and the mean fluorescence intensity (MFI) were determined by flow cytometry using a
 302 Novocyte cytometer (ACEA) and results were analyzed using FlowJo (LLC) v10.

303 *RT-qPCR*

304 Total RNA was isolated using NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel), and cDNA was
 305 synthesized with iScript cDNA synthesis kit (Bio-rad) according manufacturer's instructions.
 306 Quantitative PCR assay was done with iTaq universal SYBR Green (Bio-rad) on a lightcycler
 307 480 instrument (Roche) with specific primer for:

Primers	Forward	Reverse
CLDN1	5' - TACTCCTATGCCGCGACA - 3'	5' - GACATCCACAGCCCCTCGT - 3'
SRB1	5' - TCGCAGGCATTGGACAAACT - 3'	5' - CTCCTTATCCTTTGAGCCCTTTT - 3'
CD81	5' - ACAAGGACCAGATCGCCAAG - 3'	5' - AGTCAAGCGTCTCGTGGAAG - 3'
OCLN	5' - AGGCGAAGTTAATGGAAGCTC - 3'	5' - ATGGCAAAGTGAATGACAAGC - 3'
GAPDH	5' - GAGTCAACGGATTTGGTCGT - 3'	5' - TTGATTTTGGAGGGATCTCG - 3'

308

309 *Transfection*

310 The mCherry-CaaX plasmid (Addgene #108886) was transfected using Lipofectamine 2000
 311 (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions.

312 *Immunostaining and imaging of fixed samples*

313 Cells were grown on 12 mm diameter #1.5 glass coverslips (Electron Microscopy Sciences)
 314 in 24-well plates for 48 h. Cells were fixed for 20 min at RT in 4% PFA. The coverslips were
 315 incubated in 0.5% BSA and 0.1% Triton X100 in PBS for 30 min at RT and primary antibodies

316 were then added for 2 h at RT. Upon washes, the coverslips were incubated with fluorophore-
317 conjugated secondary antibodies for 45 min at RT. Dapi was added 5 min prior coverslip
318 washing and mounting using Fluoromount aqueous mounting medium (Sigma-Aldrich). Image
319 acquisition was performed using a Z1 inverted microscope (Nikon) mounted with a spinning
320 disk head CSU-X1 (Andor), a EMCCD iXon897 camera (Andor) and a X100 Plan Apo lambda
321 1.45 NA oil objective (Nikon) controlled by the iQ3 software (Oxford instrument Andor).

322 *Live cell imaging and FRAP*

323 Cells were grown on 30 mm diameter #1.5 glass coverslip (Lordil) in 6-well plates for 48 h.
324 Prior imaging, cells were incubated with 300 μ L of HCVcc-A647 in Fluorobright media (Gibco)
325 supplemented with 2% FBS (Sigma-Aldrich) Image acquisition was performed at 37°C and
326 5% CO₂ in a dark chamber using an AxioObserver.Z1 inverted microscope (Zeiss) mounted
327 with a spinning disc head (Yokogawa), a back-illuminated EMCCD camera (Evolve,
328 Photometrics) and a X100, 1.45 NA oil objective (Zeiss) controlled by Visiview v.3.3.0 software
329 (Visitron Systems).

330 For FRAP experiments, cells were grown on 30 mm diameter #1.5 glass coverslip (Lordil) in
331 6-well plates for 48 h. Prior imaging, cells were incubated with Fluorobright media (Gibco)
332 supplemented with 2% FBS (Sigma-Aldrich). FRAP experiments were done on an iMIC
333 videomicroscope (Till Photonics) equipped with a Cobolt Dual Calypso Laser 491/532 nm
334 (Solna) and an Olympus 60x TIRFM (1.45 NA) oil objective. During acquisition, cells were
335 maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere using an environmental control
336 system (Life Imaging Services). Images recorded before and after bleaching were acquired
337 with a Spectra X light source on an ORCA-Flash 4 CMOS camera (Hamamatsu). A region of
338 interest to be bleached of 3.36 μ m was defined. After bleaching, images were acquired every
339 2.5 s to monitor the fluorescence recovery until 310 s.

340 *Image analyses*

341 Processing and image quantification of the colocalization between HCV and OCLN at or
342 outside TJs (Figure 3B-C) was done using the Fiji version of ImageJ. Briefly, background
343 subtraction using a rolling ball radius of 100 pixels for OCLN and 20 pixels for HCV was
344 applied on all images to homogenize the signals of the fields of view. The number and location
345 of HCV signals were measured using the “analyze particle” tool, only considering particles
346 spanning 5 to 40 pixels (to eliminate background staining and aggregates). The resulting mask
347 was used to quantify the percentage of particles containing OCLN. Then, continuous OCLN
348 signals were manually tracked to quantify the number of HCV particles at TJs. The number of
349 HCV particles outside TJs was calculated by subtracting the number of particles at TJs to the
350 total number of OCLN-positive particles.

351 Live cell imaging analyses were performed on Bitplane Imaris v9.2. HCV particles dynamics
352 was measured by automated tracking over time based on absolute intensity threshold. The
353 corresponding OCLN signal was extracted and the tracking of the quantified movies was
354 manually verified to exclude potential uninterpretable tracks.

355 All the images within an experiment were acquired using same laser power and exposure time
356 for each channel. Contrast processing for visual representation was kept identical for the
357 different conditions within an experiment. For quantification, thresholding of fluorescent signal
358 was kept identical for the different conditions within an experiment.

359 *Impermeability assays*

360 Cells were cultured for 4 days on a 24-well transwell polyester membrane cell culture insert
361 with 0.4 μm pores (Corning). TEER was measured using EVOM2 Epithelial Voltohmmeter
362 (World precision instruments) and STX3 electrodes dipped into the upper and lower chambers
363 of the transwell. The TEER values reported in Ω/cm^2 correspond to the transwell area
364 multiplied by the measured resistance (Ω).

365 For the fluorescence-based permeability assay, cells grown in transwells were incubated with
366 50 μM Lucifer yellow reagent (Merck) for 2 h at 37°C and media were collected from the top
367 and bottom chambers. Fluorescence quantification was performed using a Mithras LB 940
368 multimode microplate reader (Berthold Technologies) with 488 nm excitation and a 520 nm
369 emission filter. In parallel, a calibration curve was prepared using Lucifer yellow concentrations
370 of 50, 25, 12.5 or 6.25 μM . The permeability coefficient (P_c) was calculated as follows:

$$371 \quad P_c = \frac{\text{Volume basal chamber}}{\text{Area transwell} \times \text{Initial concentration insert}} \times \frac{\text{Final concentration well}}{\text{Time}}$$

372

373 *HCVpp and VSVpp production*

374 Hek 293T cells were seed in 10 cm diameters petri-dish and transfected the day after using
375 Calcium phosphate kit (Ozyme) with three expression vectors. The first vector encoding
376 retroviral Gag and Pol proteins, the second vector encoding a reporter protein (Luciferase)
377 between LTR HIV sequences and the third vector coding for the protein of HCV envelope (E1
378 and E2) from Jc1 chimeric strain or the VSV-G envelope. Viral supernatants were collected
379 every 24 h and 48 h and filtrated through 0.45 μm filter to eliminate cell debris and stored at
380 4°C or -20°C for long storage.

381 *HCVcc production*

382 HCVcc Jc1-Luc and HCVcc Jc1^{FLAG-E2} full length RNA was generated from plasmid templates
383 using Megascript T7 transcription kit (Thermo Fisher Scientific) according to the
384 manufacturer's instructions.

385 Huh7.5.1 cells (4x10⁶) were electroporated with 5 µg of HCV RNA in Ingenio electroporation
386 solution (Mirus) using the T-001 program of Amaxa Nucleofector (Lonza). Viral supernatants
387 were collected every 48 h for up to 6-8 passages after electroporation, then centrifuge at 450
388 g for 5 min and stored at 4°C and -80°C for long storage. Harvests were concentrated 6-10
389 times on Vivaspin 20 centrifugal concentrators with 100 kDa cutoff (Sartorius) and stored at
390 4°C or -80°C for long storage.

391

392 *Virus titration*

393 *HCVcc (Jc1-Luc strain), HCVpp and VSVpp.* Huh7.5.1 cells were seeded in a 96-well plate
394 and infected the next day with 50 µL of virus. Three days post-infection, cells were lysed using
395 Glo lysis buffer (Promega), and lysate was mixed with equivalent volume of ONE-Glo
396 luciferase assay system (Promega). The amount of luciferase activity was measured using
397 Infinite F200 Pro (Tecan). The values were expressed in relative luciferase unit (RLU).

398 *HCVcc Jc1^{FLAG-E2}.* Huh7.5.1 cells were seeded in a 24-well plate (Corning) and infected the
399 next day with varying volume of virus (from 2 to 20 µL). Three days post-infection, the
400 percentage of infected cells was determined by flow cytometry using Novocyte (ACEA).
401 Results were analyzed with FlowJo V10 (LCC).

402 The FACS infectious unit by mL was calculated as follow:

403 *FACS infectious units/mL*

$$404 = \frac{\% \text{ of infected cells} \times \text{number of seeded cells} \times \text{dilution factor}}{\text{Volume of inoculum added to cells}}$$

405

406 *Purification and labeling of HCVcc Jc1^{FLAG-E2} particles*

407 Concentrated virus preparation HCVcc Jc1^{FLAG-E2} was incubated with anti-Flag M2 affinity gel
408 (Sigma-Aldrich) for 2 h at RT. The gel was pelleted at 500 g for 2 min, then washed five times
409 with PBS containing calcium and magnesium (Gibco). Bound virus was eluted with Flag
410 peptide (Sigma-Aldrich) at 100 µg/ml. Elution was performed with 1M NaHCO₃ at ratio of 1:10
411 and incubated with Alexa Fluor 647 NHS Ester (Thermofisher Scientific) or equal volume of
412 DMSO (Sigma-Aldrich) for 1 h at RT protect from light with gentle agitation every 15 min.
413 Excess of dye was eliminated by OptiMEM washes (Gibco) using Pierce concentrator, with 10
414 kDa cutoff (Thermofisher Scientific) and stored at -80°C.

415

416 Infection time-course assay

417 Huh7.5.1 cells were inoculated with serial dilutions of JFH-1 virus stock in DMEM 10% FCS.
418 The virus inoculi were removed at the indicated times and the cells were replenished with
419 warm media. Cells were further incubated for 72 h, time at which the cells were fixed and
420 processed for immunofluorescence microscopy and foci counting, using a recombinant
421 monoclonal anti-E2 antibody as previously shown (23).

422 *Statistical analysis*

423 Statistical analyses of the data were performed using two-tailed unequal variance Student t-
424 tests (ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) and the mean and standard deviation of
425 the mean were plotted using Prism. Number of independent experiments (n) is indicated in
426 each figure legend.

427

428 **Author contribution**

429 CMHC, CD and RG generated the edited cell lines. VL and RG designed and generated DNA
430 constructs for CRISPR/Cas9-mediated editing. NVAN optimized permeability assays. CMHC
431 and CD performed experiments involving virus manipulation. CMHC and RG performed live
432 cell imaging. CMHC and RG performed image analyses. CMHC, PR and YM performed and
433 analyzed the FRAP experiments. TB and YM provided reagents and expertise. RG wrote the
434 manuscript and CMHC edited and commented on the manuscript.

435

436 **Acknowledgements**

437 We thank Dr. Pablo Gastaminza for kindly sharing data on HCV infection kinetics. We would
438 like to acknowledge the MRI imaging facility for advice and training. This work was supported
439 by an ATIP-AVENIR starting grant to R.G. The salary of C.M.H.C was supported by INSERM
440 and the Region Grand-Est. C.M.D was supported by an EMBO Long Term Fellowship (EMBO
441 ALTF 1428-2016). The research leading to these results has received funding from the People
442 Program (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Program
443 (FP7/2007-2013) under REA grant agreement n. PCOFUND-GA-2013-609102, through the
444 PRESTIGE program coordinated by Campus France, and from the French Agency for
445 Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS), both attributed to NVAN. Y.M. is grateful to the
446 Institut Universitaire de France (IUF) for support and providing additional time to be dedicated
447 to research. TFB is the recipient of an ERC AdG (HEPCIR grant agreement N° 667273).

448

449 **References**

- 450 1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012.
451 CA Cancer J Clin. 2015;65(2):87-108.
- 452 2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and
453 mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal
454 of cancer Journal international du cancer. 2015;136(5):E359-86.
- 455 3. Sanduzzi-Zamparelli M, Boix L, Leal C, Reig M. Hepatocellular Carcinoma Recurrence in HCV
456 Patients Treated with Direct Antiviral Agents. Viruses. 2019;11(5).
- 457 4. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, et al. Hepatitis C
458 virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. Journal of virology. 2006;80(14):6964-72.
- 459 5. Collier KE, Berger KL, Heaton NS, Cooper JD, Yoon R, Randall G. RNA interference and single
460 particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. PLoS pathogens. 2009;5(12):e1000702.
- 461 6. Lindenbach BD, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. Nature
462 reviews Microbiology. 2013;11(10):688-700.
- 463 7. Zeisel MB, Felmlee DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry. Current topics in microbiology and
464 immunology. 2013;369:87-112.
- 465 8. Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update.
466 Journal of hepatology. 2014;61(1 Suppl):S3-S13.
- 467 9. Sourisseau M, Michta ML, Zony C, Israelow B, Hopcraft SE, Narbus CM, et al. Temporal analysis
468 of hepatitis C virus cell entry with occludin directed blocking antibodies. PLoS pathogens.
469 2013;9(3):e1003244.
- 470 10. Boulant S, Stanifer M, Lozach PY. Dynamics of virus-receptor interactions in virus binding,
471 signaling, and endocytosis. Viruses. 2015;7(6):2794-815.
- 472 11. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced
473 antiviral therapy for hepatitis C virus infection. Nature reviews Microbiology. 2013;11(7):482-96.
- 474 12. Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry
475 through epithelial tight junctions. Cell. 2006;124(1):119-31.
- 476 13. Baktash Y, Madhav A, Collier KE, Randall G. Single Particle Imaging of Polarized Hepatoma
477 Organoids upon Hepatitis C Virus Infection Reveals an Ordered and Sequential Entry Process. Cell host
478 & microbe. 2018;23(3):382-94 e5.
- 479 14. Lavie M, Linna L, Moustafa RI, Belouzard S, Fukasawa M, Dubuisson J. Role of the cytosolic
480 domain of occludin in trafficking and hepatitis C virus infection. Traffic. 2019;20(10):753-73.
- 481 15. Chou YY, Cuevas C, Carocci M, Stubbs SH, Ma M, Cureton DK, et al. Identification and
482 characterization of a novel broad spectrum virus entry inhibitor. Journal of virology. 2016.
- 483 16. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the
484 CRISPR-Cas9 system. Nature protocols. 2013;8(11):2281-308.
- 485 17. Shen L, Weber CR, Turner JR. The tight junction protein complex undergoes rapid and
486 continuous molecular remodeling at steady state. The Journal of cell biology. 2008;181(4):683-95.
- 487 18. Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, et al. Ultrastructural analysis of
488 hepatitis C virus particles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
489 America. 2013;110(23):9505-10.
- 490 19. Furuse M, Fujimoto K, Sato N, Hirase T, Tsukita S. Overexpression of occludin, a tight junction-
491 associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies
492 bearing tight junction-like structures. Journal of cell science. 1996;109 (Pt 2):429-35.
- 493 20. Chou YY, Krupp A, Kaynor C, Gaudin R, Ma M, Cahir-McFarland E, et al. Inhibition of JCPyV
494 infection mediated by targeted viral genome editing using CRISPR/Cas9. Scientific reports.
495 2016;6:36921.
- 496 21. Padilla-Rodriguez M, Parker SS, Adams DG, Westerling T, Puleo JI, Watson AW, et al. The actin
497 cytoskeletal architecture of estrogen receptor positive breast cancer cells suppresses invasion. Nature
498 communications. 2018;9(1):2980.

- 499 22. Gao Y, Li M, Chen B, Shen Z, Guo P, Wientjes MG, et al. Predictive models of diffusive
 500 nanoparticle transport in 3-dimensional tumor cell spheroids. *AAPS J.* 2013;15(3):816-31.
 501 23. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, et al. Robust hepatitis C virus
 502 infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*
 503 2005;102(26):9294-9.

504

505 **Figure legends**

506 **Figure 1. Generation of Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} edited cells.** (A) Scheme describing the
 507 targeting of *ocln* gene with the assistance of site-specific CRISPR/Cas9 endonuclease. The
 508 gRNA (blue) was designed to overlap the ATG start codon (bold blue) of the *ocln* gene to allow
 509 Cas9-dependent double-strand cut. The EGFP-linker sequence (yellow) is shown upon
 510 homologous recombination in the context of the *ocln* gene. (B) The genomic DNA of clonal
 511 Huh7.5.1 cell lines was extracted and PCR using the F_{gOCLN} and R_{gOCLN} primers (see arrows
 512 in (A)). The non-edited *ocln* gene (endogenous) is seen as a lower band, while upper bands
 513 correspond to the EGFP sequence inserted into the ATG region of *ocln* (edited). (C) Lysate of
 514 wild type or edited Huh7.5.1 cells was processed for western blot analysis using an anti-OCLN
 515 antibody. The non-edited OCLN protein (endogenous) is observed at 59 kDa and the EGFP-
 516 OCLN fusion protein has a predicted size of 87 kDa (edited). A β -Actin antibody labeling was
 517 used as loading control. (D) The proportion of OCLN and ZO1 expression was assessed by
 518 flow cytometry in wild-type and edited cells and normalized with GAPDH expression. n = 3
 519 independent experiments. Error bars represent SD. Two-tailed student t-test p value > 0.05
 520 (non-significant; ns). (E) The relative amount of OCLN, CLDN1, CD81 and SR-B1 mRNA
 521 expression was measured by RT-qPCR on RNA extraction from wild type (grey) and edited
 522 cells (green) and normalized by GAPDH mRNA expression. The bar graph corresponds to
 523 mean +/- SD from 3 individual experiments show no difference between wild-type (grey) and
 524 edited cells (green). Two-tailed student t-test p value > 0.05 (non-significant; ns).

525 **Figure 2. Functional characterization of Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} cells.** (A-C) Wild type or
 526 edited Huh7.5.1 cells were seeded on transwell inserts with 0.4 μ m pores for 4 days. (A)
 527 Scheme of the transwell system used. (B) TEER measurement was performed using a
 528 Voltohmmeter. The bar graph corresponds to the mean +/- SD from three experiments
 529 performed in duplicates. Two-tailed p value was non-significant (ns) or < 0.01 (**) or < 0.001
 530 (***). (C) The media of the upper chamber in which the cells were grown was replaced by
 531 media containing 50 μ M of Lucifer yellow and the permeability coefficient was assessed by
 532 measuring the Lucifer Yellow fluorescence intensity in the lower chamber 2 h post-incubation
 533 (see Methods for details). EDTA was used as a positive control. The bar graph corresponds
 534 to the mean +/- SD from three experiments performed in duplicates. Two-tailed p value was
 535 non-significant (ns) or < 0.01 (**) or < 0.001 (***). (D) EGFP-OCLN^{+/+} (cyan) cells and wild type
 536 cells were fixed, permeabilized and stained using antibodies against ZO1 (magenta) and Ezrin
 537 (red), and Dapi (Blue) and 3D spinning disk confocal microscopy was performed. The images
 538 represent the top view of a 3D reconstruction and the lower panels correspond to the
 539 orthogonal YZ slice extracted at the yellow line. XY scale bar = 10 μ M. YZ scale bar = 5 μ M.
 540 (E) Wild type and EGFP-OCLN^{+/+} cells were inoculated with the luciferase reporter viruses
 541 Jc1-Luc strain (HCVcc) or VSV-G pseudoparticles (VSVpp). Luminescence was measured at
 542 72 h post-infection. RLU: Relative luminometer units. The bar graph corresponds to the mean
 543 +/- SD from three experiments performed in triplicates. Two-tailed p value was < 0.01 (**)
 544 or < 0.001 (***). (F) The data for HCVcc shown in (E) were normalized for each cell line by the
 545 value obtained from the VSVpp infection. Ns: non-significant.

546 **Figure 3. Quantification of OCLN-positive HCV particles upon infection.** Huh7.5.1 EGFP-
547 OCLN^{+/+} cells were grown on coverslips, incubated with HCVcc-A647 and fixed at indicated
548 time post infection and mounted in Dapi-fluoromount for confocal imaging. (A) Representative
549 3D confocal images (top view) of EGFP-OCLN^{+/+} (cyan) and HCVcc-A647 (magenta) acquired
550 from cells infected for 5 h. Scale bar = 5 μ m. The yellow arrows highlight two HCVcc particles
551 at the surface of the cell, arrow 2 colocalizing with OCLN signal. The white dotted line shows
552 the position of the TJ. (B-C) The bar graph shows the percentage of HCVcc-A647 particles
553 OCLN-positive colocalizing outside (B) or at (C) TJs at indicated time post-infection quantified
554 using ImageJ. Each dot corresponds to a field of view. n = 9-10 field per time point.

555 **Figure 4 Live cell imaging of HCV-OCLN association.** Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} cells were
556 incubated with HCVcc-A647 for 1 to 5 h prior imaging using a spinning disc confocal
557 microscope. Three-dimensional images were acquired every 15 s for 30-45 min. (A) The left
558 panel shows a top view of a 3D stack in which the EGFP-OCLN (cyan) and HCVcc-A647
559 (magenta) signals were merged Scale bar = 10 μ m. The right panels, and associated Movie
560 S1, show a time-lapse series magnified from the white square. The yellow arrowheads
561 highlight a single HCV particle colocalizing with OCLN and concomitantly disappearing,
562 suggestive of an endocytic event. No recruitment of HCV particles to the TJs could be
563 observed. Scale bar = 5 μ m. (B) Representative single particle tracking of a HCV virion
564 colocalizing with EGFP-OCLN outside TJs. The left panel shows snapshots extracted at
565 different time post acquisition. The middle panel depicts the tracked movement of the HCV
566 particle. The right graph shows the fluorescence intensity of OCLN (cyan, right axis) and the
567 associated speed of the HCV particle (grey, left axis) as a function of time. (C) The dot plots
568 show a statistically significant inversed correlation between the speed of the HCV particles at
569 each time as a function of the relative fluorescence intensity of EGFP-OCLN. N = 6 movies
570 per condition. Pearson correlation coefficient < 0.001.

571

572 Supplemental Figure legends

573 **Figure S1. Characterization of Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} cells.** (A) Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+}
574 (cyan) cells were fixed, permeabilized and stained using antibodies against OCLN (magenta;
575 top panels) and Dapi (Blue) and 3D spinning disk confocal microscopy was performed. The
576 four first images represent the top view of a 3D reconstruction and the right image correspond
577 to a tilted 3D reconstruction of the merge fluorescent signals from the left images. Scale bar =
578 10 μ m. (B) Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} (cyan) cells were transfected with a mCherry-CaaX (red)
579 expressing construct and 48 h later fixed, permeabilized and stained using antibodies against
580 Ezrin (magenta) and Dapi (Blue) and 3D spinning disk confocal microscopy was performed.
581 The top images represent the top view of a 3D reconstruction and the lower panels correspond
582 to the orthogonal YZ slice extracted at the indicated yellow lines. XY scale bar = 10 μ m. YZ
583 scale bar = 5 μ m.

584 **Figuer S2. Relative diffusion of EGFP-OCLN in edited cells.** Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} cells
585 were seeded on coverslips and imaged by video-microscopy. A 3.36 μ m diameter region along
586 TJs was photobleached and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) was
587 measured. (A) Snapshots from a representative time-lapse imaging of EGFP-OCLN (cyan)
588 performed before FRAP (0 s), right after FRAP (13 s) and at indicated times post acquisition.
589 Scale bar = 5 μ m. (B) The graph shows dependence of the mean fluorescence intensity +/-
590 SD over time normalized by the initial fluorescence from five FRAP experiments. (C-D)
591 Percentage of fluorescence recovery (C) and T_{1/2} recovery (D) +/- SD measured upon EGFP-
592 OCLN photobleaching were calculated from 40 FRAP experiments acquired for 310 s each.

593 **Figure S3. Generation of HCVcc fluorescente particules.** (A) Scheme of the pipeline
594 developed to obtain HCVcc-A647 concentration, purification and labelling. (B) Huh7.5.1 wild
595 type cells were inoculated with the concentrate virus (HCVcc) or the elute virus (HCVcc IP),
596 the fluorescent virus (HCVcc-A647) or labelling control virus (HCVcc DMSO). Infectivity was
597 measured at 72h post-infection by FACS. The bar graph represents the FACS infectious
598 unit/mL calculated.

599 **Figure S4. Infectivity time curve of HCVcc.** Huh7.5.1 cells were inoculated with serial
600 dilution of HCVcc, inoculi was remove at indicated times and 72h post infection infected cells
601 were quantified by immunofluorescence microscopy. The bar graph corresponds to the mean
602 +/- SD from three experiments performed in triplicates.

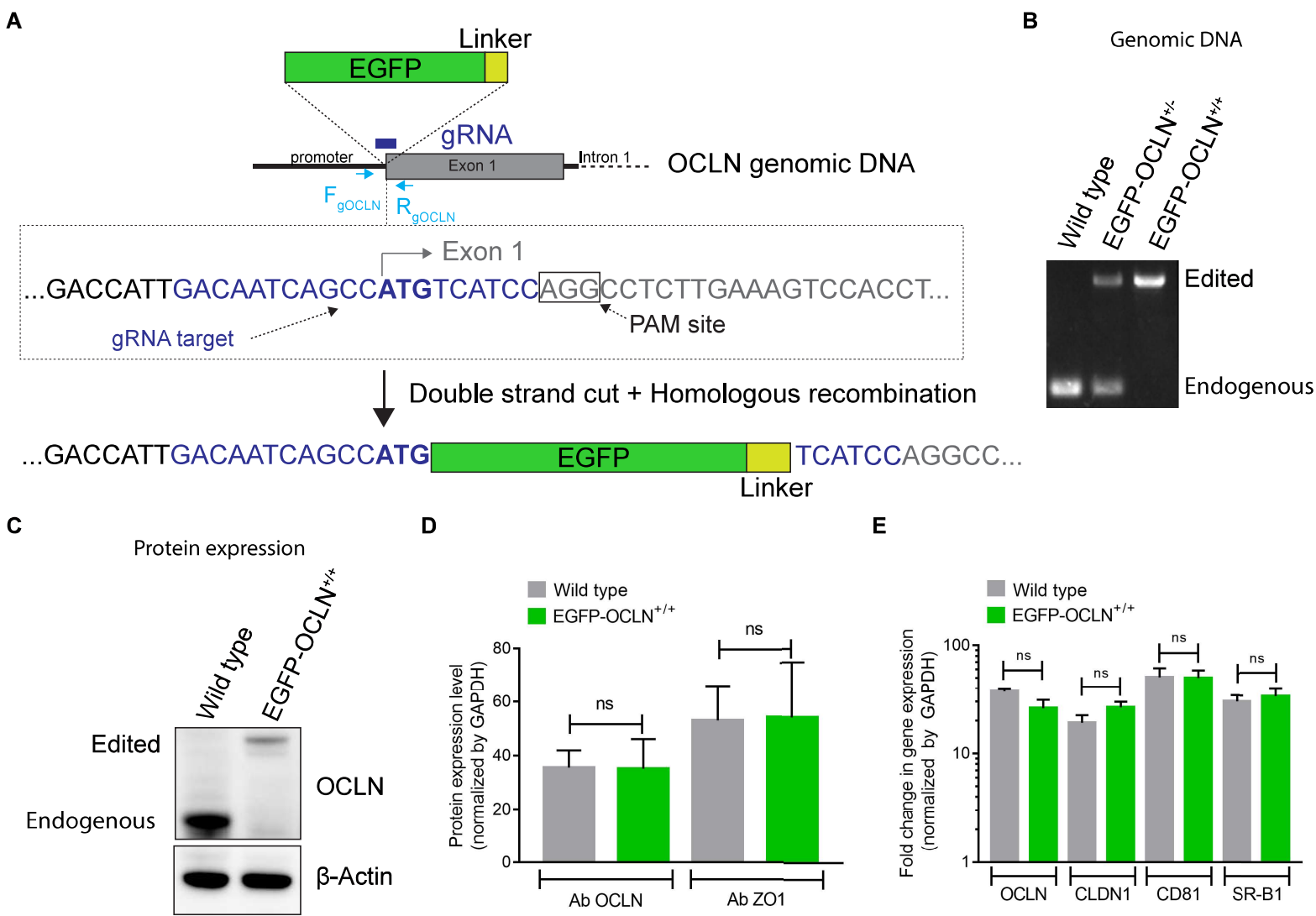
603

604 **Movie S1 Spatio-temporal dynamics of HCV particles upon infection.** Huh7.5.1 EGFP-
605 OCLN^{+/+} cells were incubated with HCVcc-A647 for 3 h prior imaging using a spinning disc
606 confocal microscope. Three-dimensional images were acquired every 15 s for 15 min. The
607 movie shows a top view of a 3D stack with EGFP-OCLN (cyan, left panel), HCVcc-A647
608 (magenta, middle panel) and merged signals (right panel). Scale bar = 10 μ M. HCVcc-A647
609 was not directed nor moving toward TJs. The movie is associated to the montage shown in
610 Figure 4A.

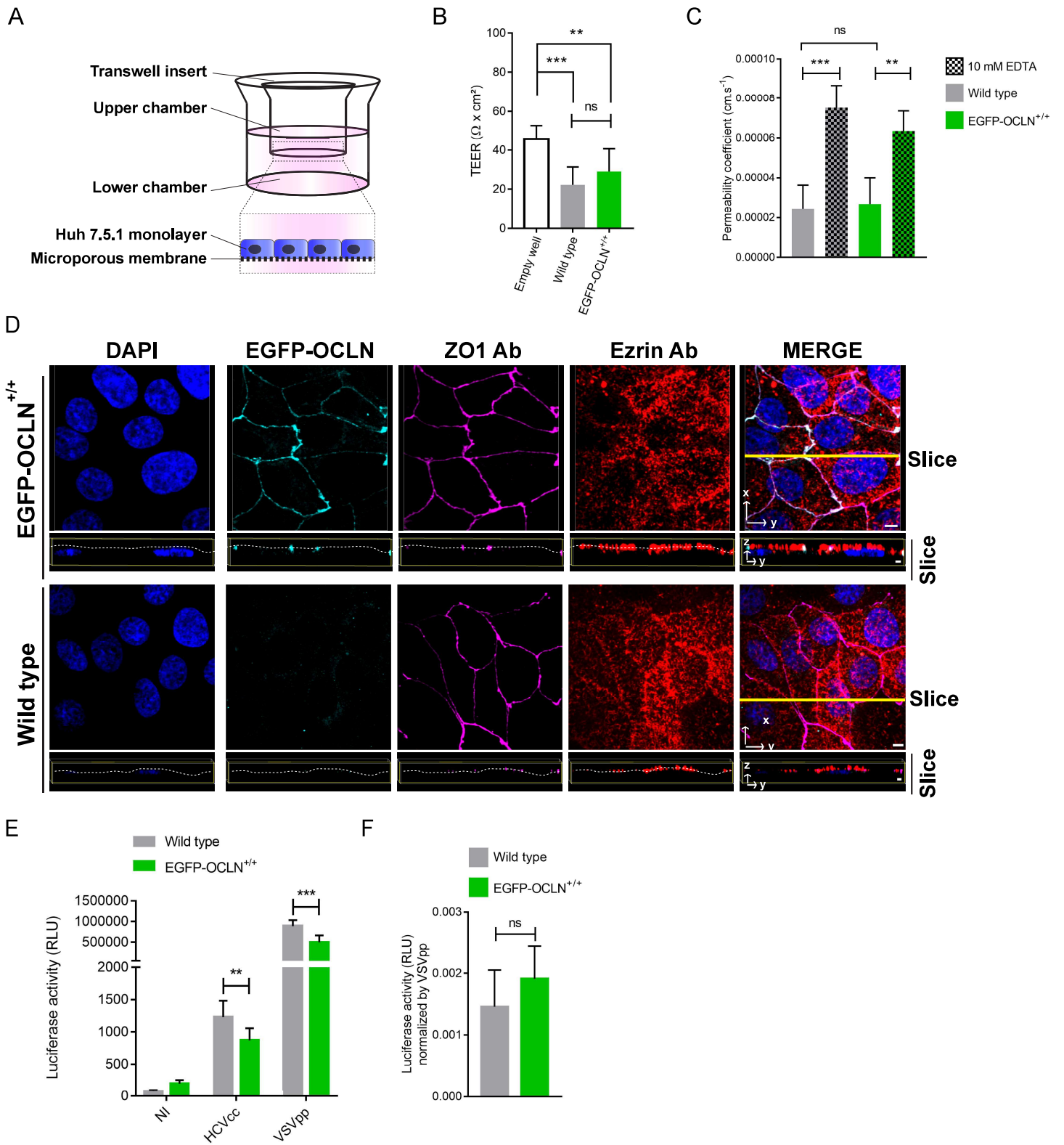
611 **Movie S2 Live cell imaging of HCV-OCLN association.** Huh7.5.1 EGFP-OCLN^{+/+} cells were
612 incubated with HCVcc-A647 for 3 h prior imaging using a spinning disc confocal microscope.
613 Three-dimensional images were acquired every 15 s for 50 min. The movie shows a
614 representative top view of a 3D stack were a single particle of a HCVcc-A647 (magenta)
615 colocalizing with EGFP-OCLN (cyan) outside TJs. Scale bar = 10 μ M. The recruitment of
616 EGFP-OCLN under HCVcc-A647 correlate to a speed decrease of the HCV-OCLN complex.
617 The movie is associated to the montage shown in Figure 4B.

618

619

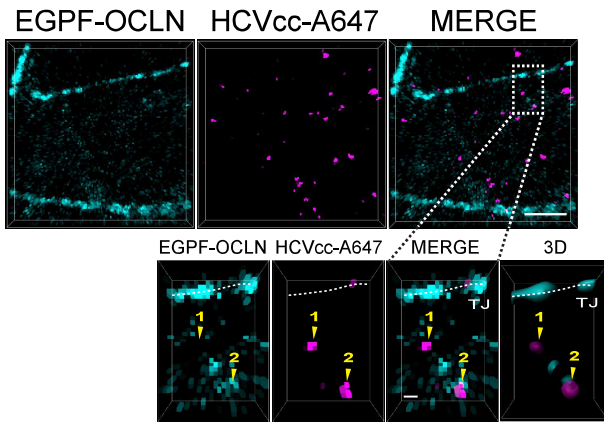


Clément et al. Figure 1

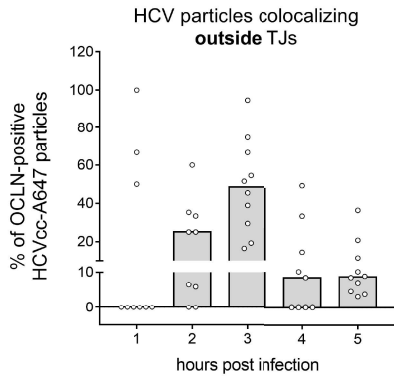


Clément et al. Figure 2

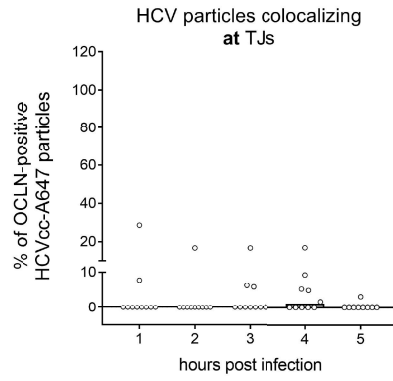
A



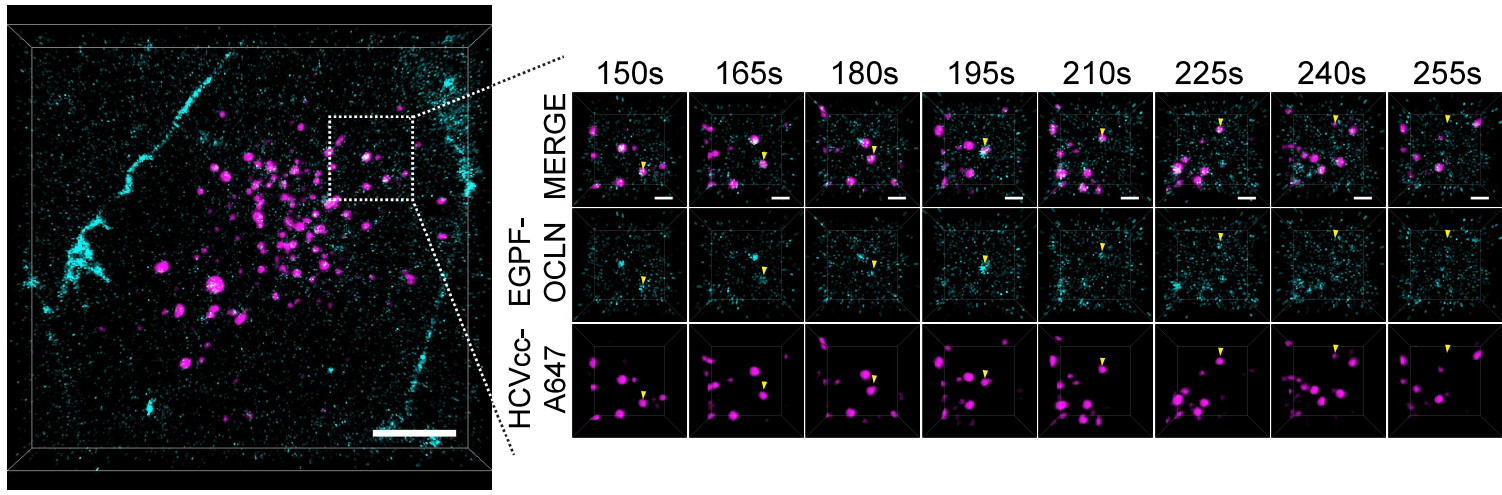
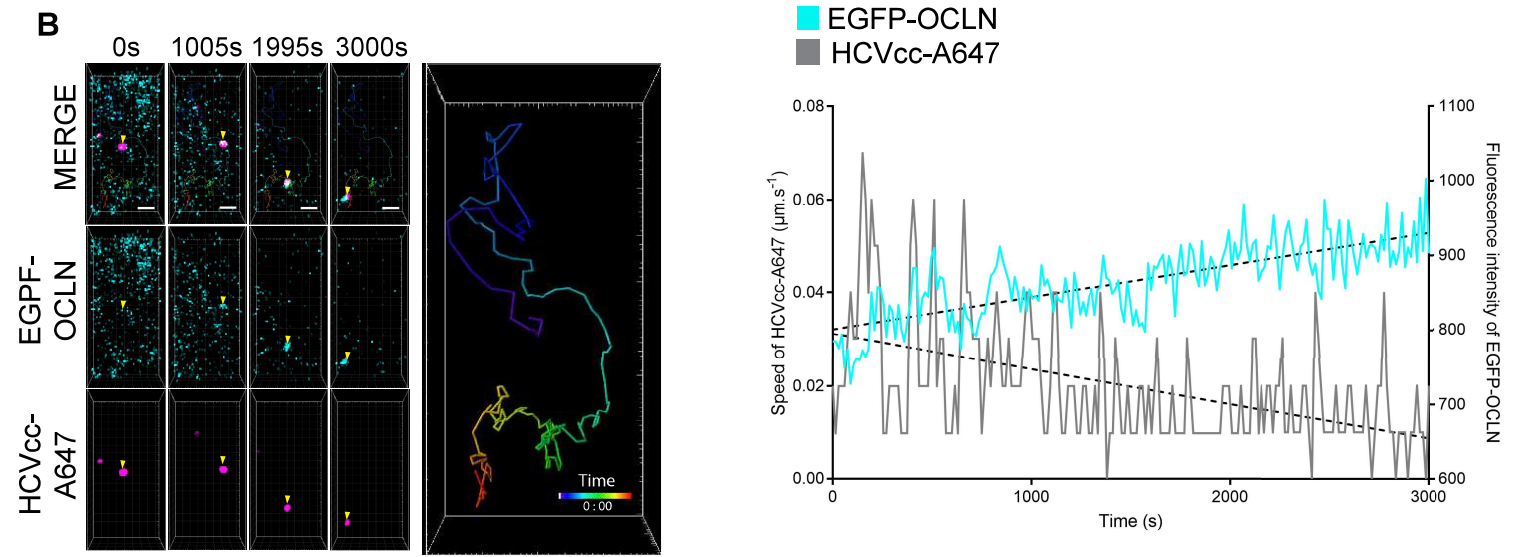
B



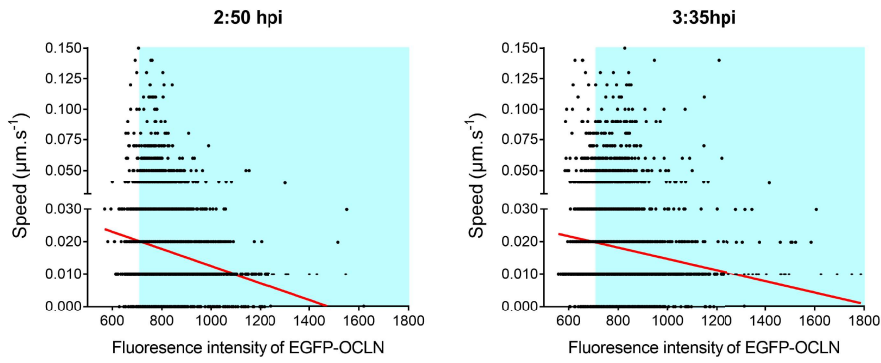
C



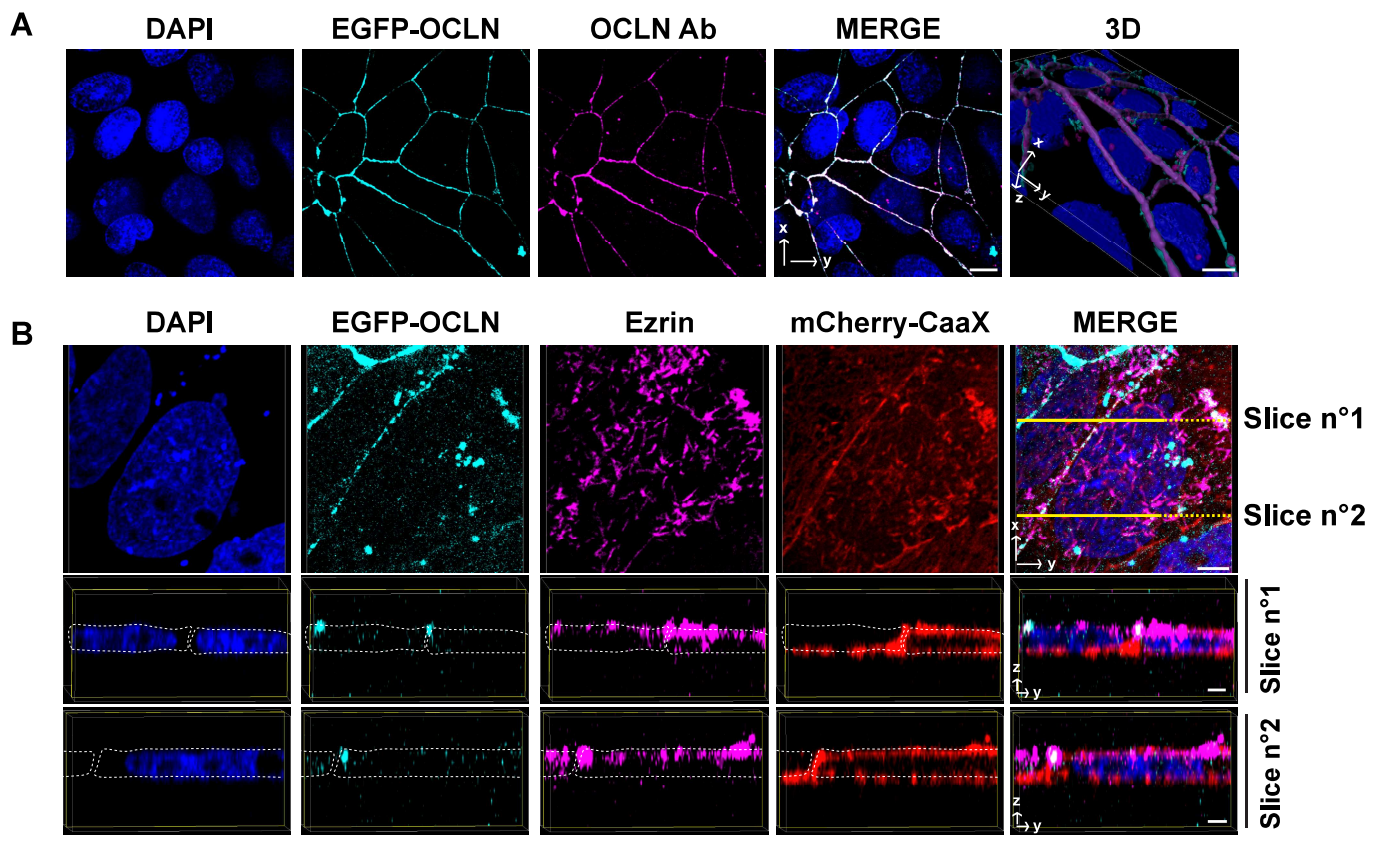
Clément et al. Figure 3

A**B****C**

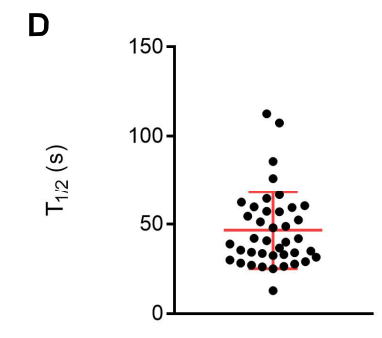
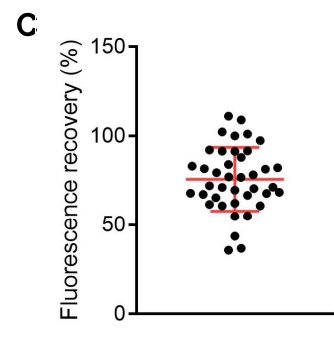
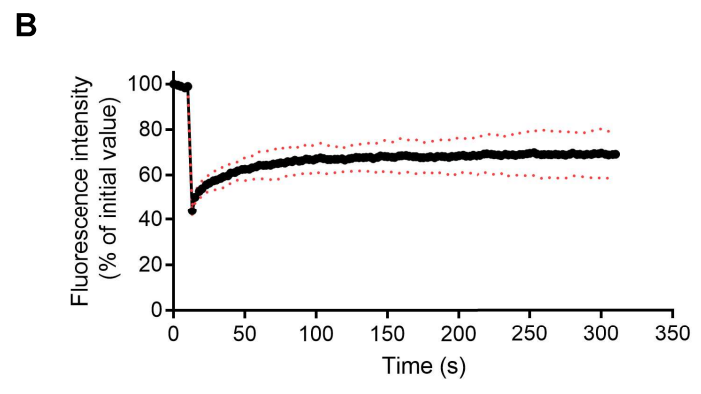
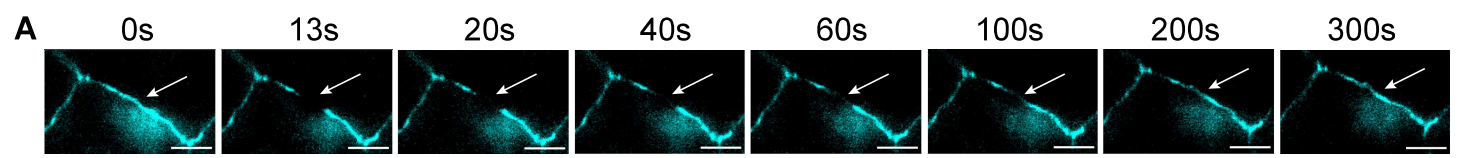
- HCVcc-A647
- Threshold of EGFP-OCLN positive particles



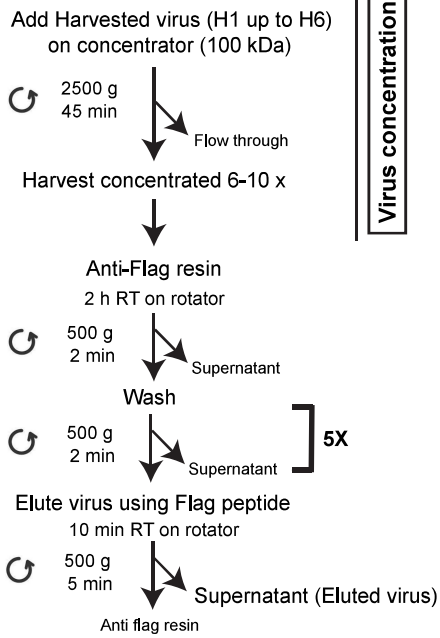
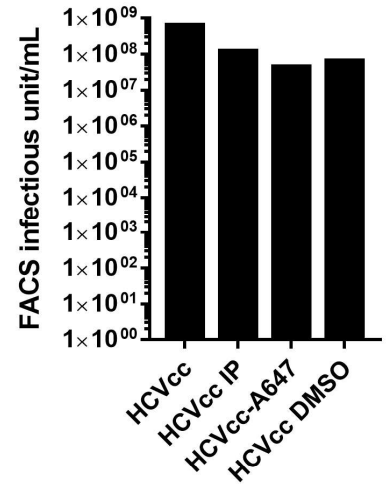
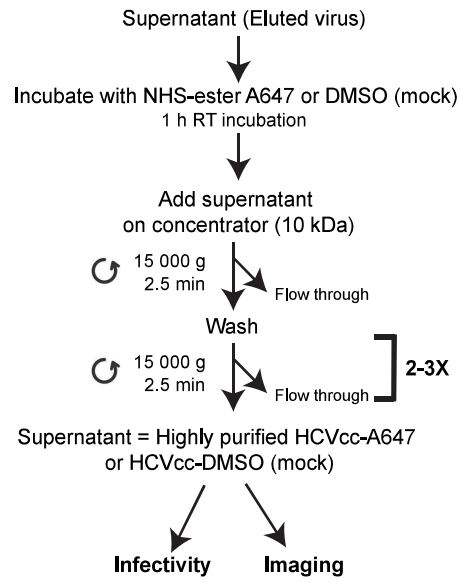
Clément et al. Figure 4



Clément et al. Figure S1

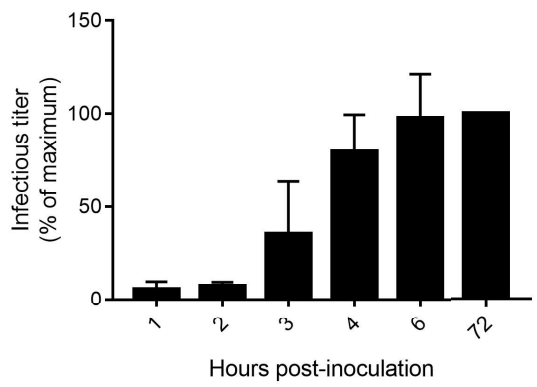


Clément et al. Figure S2

A**High purification****B**

Clément et al. Figure S3

A



Clément et al. Figure S4

Camille CLEMENT
**Etude de la dynamique
spatiotemporelle des
interactions VHC-récepteurs**

Résumé

Pour infecter les hépatocytes le virus de l'hépatite C (VHC) interagit avec de nombreux facteurs d'entrées et la dynamique d'interaction du VHC avec ces récepteurs lui permettra d'entrer dans la cellule. Parmi eux, Claudin 1 (CLDN1) et Occludin (OCLN), des protéines majeures composant les jonctions serrées (TJs). La dynamique d'interaction spatiotemporelle et ainsi que le lieu de l'interaction restent controversés. Durant ce travail de thèse j'ai utilisé l'imagerie sur cellule vivante pour étudier cette dynamique d'interaction. J'ai développé des outils biologiques pour l'imagerie et ainsi généré plusieurs lignées cellulaires exprimant à un niveau endogène l'OCLN et la CLDN1 en fusion à une étiquette et obtenue du VHC fluorescent. L'imagerie sur cellules vivantes et le suivie de particules virales uniques a démontré que l'interaction VHC-OCLN se faisait en dehors de TJs et que l'OCLN semblerait stabiliser le complexe VHC-récepteurs pour permettre son endocytose.

Mots-clés : Virus de l'hépatite C, Occludin, interaction virus-hôte, édition génomique, imagerie en temps réel

Abstarct

To infect hepatocytes the hepatitis C virus (HCV) interacts with many entry factors and the dynamics of HCV interaction with these receptors lead to virus uptake. Among them, Claudin 1 (CLDN1) and Occludin (OCLN), major proteins composing the tight junctions (TJs). The dynamics of spatiotemporal interaction and the location of the interaction remain unclear and controversial. During my PhD I used live cell imaging to study spatiotemporal dynamics of HCV-receptors. I developed biological imaging tools and generated several cell lines that endogenously expressed OCLN and CLDN1 fused to a fluorescent tag and labeled HCV particles. Live cell imaging and tracking of single viral particles demonstrated that the HCV-OCLN interaction occurs outside of TJs and that the OCLN seems to stabilize the HCV-receptor complex to allow its uptake in the cell.

Key words : hepatitis C virus, Occludin, virus-host interactions, gene editing, live cell imaging