



HAL
open science

Le rôle de CD81 et de ses protéines associées dans le mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite C

Vera Rocha Perugini

► **To cite this version:**

Vera Rocha Perugini. Le rôle de CD81 et de ses protéines associées dans le mécanisme d'entrée du virus de l'hépatite C. Biologie cellulaire. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT: . tel-00326374

HAL Id: tel-00326374

<https://theses.hal.science/tel-00326374>

Submitted on 2 Oct 2008

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE II

École Doctorale Biologie et Santé de LILLE

Pour l'obtention du grade de :

Docteur de l'UNIVERSITÉ DE LILLE II

Le rôle de CD81 et de ses protéines associées dans le mécanisme d'entrée du Virus de l'Hépatite C

Présentée et soutenue publiquement par :

Vera Pires Ferreira ROCHA PERUGINI

Le 26 septembre 2008

Devant le Jury composé de :

Pr. Didier HOBBER

Dr. Claude BOUCHEIX

Dr. François-Loïc COSSET

Dr. Annie CAHOUR

Dr. Jamal KHALIFE

Dr. Laurence COCQUEREL-DEPROY

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directrice de Thèse

A Gabriel,

Sem você, nada disso teria sido possível.

Sans toi, rien de tout cela n'aurait été possible.

*Há homens que lutam um dia, e são bons;
Há outros que lutam um ano, e são melhores;
Há aqueles que lutam muitos anos, e são muito bons;
Porém há os que lutam toda a vida
Estes são os imprescindíveis*

*Il y a des êtres humains qui luttent un moment, et c'est bien ;
Des êtres qui luttent un certain temps, et c'est mieux ;
Des êtres qui luttent pendant longtemps, et c'est très bien ;
Puis, il y a ceux qui luttent toute une vie
Ce sont eux, les indispensables*

Berthold Brecht

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je voudrais remercier Laurence pour ces quatre années passées au laboratoire, pour son orientation et support. Elle a été extrêmement importante pour ma formation dans la recherche et pour le développement de mon raisonnement scientifique. Encore une fois merci.

Merci aux membres de mon jury de thèse : Claude Boucheix, François Loïc Cosset, Didier Hober, Annie Cahour et Jamal Khalife, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux.

Merci à Jean de m'avoir acceptée dans son laboratoire ainsi que d'être un chef accessible. Son aide était importante, surtout pour la fusion des hybridomes !

Merci à mon *ancien demi-chef*, Czeslaw, pour les discussions/monologues sur les projets, sur les résultats et sur la vie en général. Les repas et les pauses cafés étaient toujours à la fois drôles et constructifs.

Merci à Sophana pour son amitié, pour les conseils informatiques et électroniques, pour les figures et surtout pour les blagues !

Merci au groupe des *mange-tard*, qui s'est développé au fil des années... Laurence, Czes, Sophana, André, David, Pierre-Yves et Khaled. Un merci spécial à David pour le travail qu'on a fait ensemble et pour sa camaraderie, et un autre à André, le pape de la culture cell, des IF et des bateaux !

Merci au groupe *wint*, groupe des filles : Claire, Alicia, Yohanna, Birke et... bienvenue Julie.

Merci à Muriel pour le travail et l'amitié pendant toutes ces années, et à Pauline pour le support technique, essentiel pendant la production d'anticorps. A quatre mains c'est beaucoup plus facile...

Merci à Lucie pour tous les moments d'amusement et pour toutes les vannes, et à Yves pour les questions et remarques toujours pertinentes et, bien sûr, pour les mauvaises blagues.

Merci à toute l'équipe HCV, passée et présente : Alex, Angéline, Annia, la grande Anne, la petite Anne, Cécile, François, Gilles et l'équipe d'Amiens, Hann, Ioan, Jonathan, Karin, Kevin, Laure, Lauren, Manue, Mathilde, Nathalie, Ngoc, Rodrigo, Sabah, Sandrine et Yann.

Merci à Julie Bertout pour l'utilisation du cytomètre à flux, à Hervé Drobecq pour la spectrométrie de masse, à Marco, Thierry et Christophe pour les aides respectives pendant la conception du protocole de production d'anticorps monoclonaux, pour la réalisation des immunisations et pour les discussions sur les résultats obtenus.

Merci à Eric Rubinstein et François Le Naour pour les discussion sur *wint*.

Je remercie également mes amis brésiliens, qui de loin m'ont également supportée, par e-mail, par téléphone et parfois en venant nous rendre visite. Les vrais amis le sont jusqu'à aujourd'hui.

Enfin, mon merci le plus spécial, je l'adresse à mes parents, surtout à mon père, pour leur support inconditionnel pendant toutes ces années, pour les bonnes discussions (au téléphone) pendant les moments difficiles... pour tout.

Obrigada por serem como são.

SOMMAIRE

RESUME	8
ABSTRACT	9
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	10
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION.....	13
I. L'HEPATITE C.....	13
1. LA DECOUVERTE DE L'AGENT RESPONSABLE DE LA MALADIE.....	13
2. L'EPIDEMIOLOGIE.....	13
2.1. <i>La prévalence de l'infection à travers le monde.....</i>	<i>13</i>
2.2. <i>Les modes de contamination</i>	<i>14</i>
3. LES TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC.....	15
4. LA PATHOGENESE DE L'INFECTION.....	16
4.1. <i>L'évolution de la maladie et les symptômes cliniques.....</i>	<i>16</i>
4.1.1. L'hépatite C aiguë	17
4.1.2. L'hépatite C chronique	17
4.1.3. Les manifestations extra-hépatiques.....	18
4.2. <i>La réponse immunologique de l'hôte et la persistance virale</i>	<i>18</i>
5. LES TRAITEMENTS	23
II. LE VIRUS DE L'HEPATITE C (VHC).....	26
1. LA CLASSIFICATION ET LA VARIABILITE GENOMIQUE	26
1.1. <i>L'émergence et la diversification des génotypes</i>	<i>27</i>
1.2. <i>La distribution mondiale des génotypes</i>	<i>28</i>
1.3. <i>Les génotypes et la pathogenèse de la maladie</i>	<i>29</i>
2. LES PROPRIETES BIOPHYSIQUES DE LA PARTICULE VIRALE.....	30
3. L'ORGANISATION DU GENOME.....	32
3.1. <i>Les extrémités non codantes.....</i>	<i>32</i>
3.1.1. La région 5' non codante	32
3.1.2. La région 3' non codante	32
3.2. <i>Les protéines virales.....</i>	<i>33</i>
3.2.1. La protéine C.....	33
3.2.2. La protéine F	34
3.2.3. Les protéines d'enveloppe E1 et E2.....	35
3.2.4. La protéine p7	35
3.2.5. La protéine NS2.....	35
3.2.6. Les protéines NS3 – NS4A	36
3.2.7. La protéine NS4B	37
3.2.8. La protéine NS5A.....	37
3.2.9. La protéine NS5B.....	38
4. LES MODELES D'ETUDE.....	39
4.1. <i>Les modèles animaux.....</i>	<i>39</i>
4.2. <i>Les modèles cellulaires.....</i>	<i>40</i>
4.2.1. Les cellules infectées par du VHC isolé de sérums de patients.....	40
4.2.2. Les systèmes d'expression hétérologue des protéines structurales.....	41
4.2.3. Les pseudo-virions et virosomes	43
4.2.4. Les particules rétrovirales pseudotypées avec E1 et E2 du VHC	44
4.2.5. Les réplicons	44
4.2.6. Les particules du VHC produites en culture cellulaire	45

5. LE CYCLE VIRAL	47
5.1. L'entrée du VHC dans ses cellules cibles	48
5.2. La synthèse des protéines et la réplication virale.....	50
5.3. L'assemblage et la sécrétion virale	50
III. L'ENTREE DU VHC DANS SES CELLULES CIBLES	53
1. LES GLYCOPROTEINES D'ENVELOPPE E1 ET E2	53
2. LES PROTEINES CELLULAIRES IMPLIQUEES DANS L'ENTREE DU VHC	58
2.1. Les molécules d'attachement	58
2.2. Les récepteurs	60
2.2.1. La tétraspanine CD81	60
2.2.2. Le scavenger récepteur classe B de type I (SR-BI)	66
2.2.3. Les molécules des jonctions serrées Claudines	69
2.3. L'internalisation du VHC.....	73
IV. LES TETRASPANINES ET LEURS PARTENAIRES	76
1. LA STRUCTURE DES TETRASPANINES.....	77
1.1. Les domaines extracellulaires.....	78
1.2. Les domaines transmembranaires	79
1.3. Les domaines intracellulaires	80
2. LES MICRODOMAINES ENRICHIS EN TETRASPANINES.....	81
2.1. Les partenaires moléculaires.....	86
2.2. <i>EWI-2</i> et les autres membres de la famille <i>EWI</i>	88
2.2.1. L'expression tissulaire et localisation subcellulaire des protéines <i>EWI</i>	91
2.2.2. Les fonctions des protéines <i>EWI</i>	93
3. L'EXPRESSION TISSULAIRE ET LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES TETRASPANINES.....	95
4. LA FONCTION DES TETRASPANINES	97
4.1. Les ligands des tétraspanines	98
4.2. L'influence des tétraspanines dans les fonctions de leurs partenaires	99
4.3. Tétraspanines et remaniements membranaires	102
4.4. Tétraspanines et système immunitaire.....	103
4.6. Tétraspanines et autres systèmes	105
4.6. Tétraspanines et cancer.....	105
5. LES TETRASPANINES ET PATHOLOGIES D'ORIGINE INFECTIEUSE	106
5.1. Tétraspanines et <i>VIH</i>	107
5.2. Tétraspanines et infections bactériennes	111
5.3. Tétraspanines et <i>Plasmodium</i>	112
OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	117
RESULTATS	119
I. ARTICLE 1	119
II. ARTICLE 2	133
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	165
1. LE PARTENAIRE DE CD81, <i>EWI-2wint</i> , INHIBE L'ENTREE DU VHC	165
2. CARACTERISATION DU MECANISME INHIBITEUR D' <i>EWI-2wint</i>	167
2.1. Les domaines d'interaction entre <i>CD81</i> et <i>EWI-2wint</i>	168
2.2. <i>EWI-2wint</i> et l'association/dissociation de <i>CD81</i> avec d'autres molécules	169
2.3. <i>EWI-2wint</i> et <i>CD81</i> , les voies de signalisation et l'interaction avec le cytosquelette	170
3. CARACTERISATION DE LA PROTEINE <i>EWI-2wint</i>	172
3.1. Clivage d' <i>EWI-2</i> pour former <i>EWI-2wint</i>	172
3.2. Profil d'expression tissulaire et cellulaire d' <i>EWI-2wint</i>	173
3.3. La voie de sécrétion et les modifications post-traductionnelles subies par <i>EWI-2wint</i>	174

4. L'IMPACT DU NIVEAU D'EXPRESSION DE CD81 DANS L'INFECTION PAR LE VHC.....	175
5. L'ENTREE DU VHC, LA COMPOSITION LIPIDIQUE MEMBRANAIRE ET CD81 ASSOCIEE AUX TEM.....	178
6. HYPOTHESES POUR L'ENTREE DU VHC	182
CONCLUSION	187
BIBLIOGRAPHIE	189

RESUME

Le virus de l'hépatite C (VHC) touche 2 à 3% de la population mondiale et la plupart des individus infectés développent une hépatite chronique qui est fortement associée au développement d'un cancer du foie. Bien que les mécanismes de régulation de l'entrée du VHC dans ses cellules cibles, les hépatocytes, soient encore très mal connus, plusieurs protéines de surface cellulaire ont été identifiées comme des facteurs nécessaires à l'entrée virale. Parmi ces protéines, la tétraspanine CD81 est essentielle à l'entrée du VHC. Les membres de la famille des tétraspanines ont la particularité de s'associer entre eux et avec d'autres protéines, appelées partenaires, pour former des complexes multimoléculaires dans des microdomaines appelés microdomaines enrichis en tétraspanines (TEM). Dans notre étude, nous avons analysé le rôle de CD81 et de ses protéines associées dans le mécanisme d'entrée du VHC. En effet, nous avons identifié un nouveau partenaire de CD81, EWI-2wint, qui inhibe l'infection par le VHC, et nous avons analysé le rôle de la fraction de CD81 associée aux TEM dans l'infection par le VHC.

Dans un premier temps, nous avons donc montré qu'EWI-2wint, un nouveau partenaire de CD81, est exprimé dans différentes lignées cellulaires mais pas dans les hépatocytes. L'expression ectopique d'EWI-2wint dans des Huh-7, une lignée de cellules hépatiques susceptibles à l'infection par le VHC, bloque l'entrée virale. Nous avons pu montrer que ce blocage se fait par une inhibition de l'interaction entre CD81 et les glycoprotéines d'enveloppe présentes à la surface des particules virales. Notre travail suggère ainsi que l'hépatotropisme du VHC ne serait pas lié uniquement à la présence de facteurs d'entrée spécifiques, mais également à l'absence du facteur inhibiteur EWI-2wint. Ce type de mécanisme de contrôle de l'entrée virale par un inhibiteur cellulaire n'avait jamais été décrit auparavant.

En parallèle, en utilisant des particules du VHC hautement infectieuses produites en culture cellulaire, nous avons isolé des clones cellulaires indépendants présentant des niveaux d'infection variables. Parmi ces clones, un clone résistant à l'infection avait perdu l'expression de CD81 (cellules Huh-7w7). L'expression ectopique de la CD81 humaine (hCD81) dans ce clone a permis de restaurer la permissivité en Huh-7. De manière intéressante, l'expression ectopique de la CD81 d'origine murine (mCD81) dans les cellules Huh-7w7 a également permis de restaurer la permissivité au virus, suggérant que la mCD81 dans un contexte cellulaire humain est capable de mimer la hCD81 dans le mécanisme d'entrée du VHC et probablement dans les interactions avec les facteurs cellulaires. Nous avons donc utilisé ces cellules exprimant la mCD81 et des anticorps monoclonaux décrits précédemment, MT81/MT81w, pour analyser le rôle de CD81 associée aux TEM dans l'infection par le VHC. L'anticorps MT81w, qui reconnaît uniquement CD81 associée aux TEM, n'inhibait pas l'infection et la déplétion des cellules en cholestérol, qui inhibe l'infection, n'affectait pas les niveaux de CD81 associée aux TEM. De manière similaire, le traitement des cellules avec de la sphingomyélinase, qui réduit l'infection, augmentait les niveaux de CD81 associée aux TEM. En résumé, nous avons montré que l'entrée du VHC dans ses cellules cibles est directement liée au niveau d'expression de CD81 et la sous-population de CD81 associée aux TEM ne semble pas participer aux étapes initiales du cycle viral du VHC.

Mots clés : VHC, mécanisme d'entrée, tétraspanine, CD81, EWI-2wint, TEM

ABSTRACT

Between 2 and 3 percent of the world population is chronically infected with hepatitis C virus (HCV) and thus at risk of developing liver cancer. Although precise mechanisms regulating HCV entry into hepatic cells are still unknown, several cell surface proteins have been identified as entry factors for this virus. Among these molecules, tetraspanin CD81 is essential for HCV entry. A major characteristic of tetraspanins is their ability to interact with each other and with other transmembrane proteins, thus building membrane multi-molecular complexes, collectively referred to as the tetraspanin enriched microdomains (TEM). In our study, we analysed the role of CD81 and its associated proteins in HCV entry mechanism. We identified a partner of CD81, EWI-2wint, which inhibits HCV infection. We also analyzed the role of TEM-associated CD81 fraction in HCV infection.

During the first part of this work, we showed that EWI-2wint, a new CD81 partner, is expressed in several cell lines but not in hepatocytes. Ectopic expression of EWI-2wint in Huh-7, a hepatoma cell line susceptible to HCV infection, blocked viral entry by inhibiting the interaction between CD81 and the HCV envelope glycoproteins present on the surface of viral particles. This finding suggests that, in addition to the presence of specific entry factors in the hepatocytes, the lack of a specific inhibitor can contribute to the hepatotropism of HCV. This is the first example of a pathogen gaining entry into host cells that lack a specific inhibitory factor.

In parallel of this study, successive infections of Huh-7 target cells with highly infectious HCV particles produced in cell culture allowed us to isolate cellular clones exhibiting different HCV infection levels. One of these cellular clones was resistant to HCV infection and had lost CD81 expression (Huh-7w7 cells). Ectopic expression of human CD81 (hCD81) in Huh-7w7 cells restored HCV permissivity. Interestingly, ectopic expression of mouse CD81 (mCD81) in Huh-7w7 cells was also able to restore HCV permissivity, indicating that mCD81 in the context of human hepatocytes mimicks hCD81 in HCV entry and likely in interactions with cellular factors. We then took advantage of these permissive cells expressing mCD81 and the previously described MT81/MT81w monoclonal antibodies to analyze the role of the TEM-associated CD81 in HCV infection. We showed that MT81w antibody that only recognizes TEM-associated mCD81 did not inhibit HCV infection and cholesterol depletion, which inhibits HCV infection, did not affect TEM-associated CD81 levels. Similarly, sphingomyelinase treatment, which also reduces HCV infection, raised TEM-associated CD81 levels. In summary, we showed that HCV entry is directly related to CD81 expression level in hepatoma cells and populations of CD81 associated with TEM do not seem to participate in the early steps of HCV life cycle.

Keywords: HCV, entry process, tetraspanin, CD81, EWI-2wint, TEM

Liste des figures et tableaux

FIGURE 1. LA PREVALENCE DU VHC A TRAVERS LE MONDE.....	14
FIGURE 2. PATHOGENESE DU VHC.....	16
FIGURE 3. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REPOSE IMMUNITAIRE CELLULAIRE AU COURS DE L'INFECTION AIGUË PAR LE VHC.....	20
FIGURE 4. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA FAMILLE DES <i>FLAVIVIRIDAE</i>	26
FIGURE 5. ARBRE PHYLOGENETIQUE REALISE A PARTIR DES SEQUENCES CODANTES COMPLETES DES DIFFERENTS GENOTYPES DU VHC.....	27
FIGURE 6. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES DIFFERENTS GENOTYPES DU VHC.....	28
FIGURE 7. A) REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE PARTICULE DU VHC. B) ORGANISATION GENOMIQUE DU VHC.....	31
FIGURE 8. LES PROTEINES DU VHC ET LEUR ASSOCIATION AVEC LA MEMBRANE DU RE.....	33
FIGURE 9. MODELES D'ETUDE DE L'ENTREE DU VHC DANS LES CELLULES CIBLES <i>IN VITRO</i>	42
FIGURE 10. CYCLE VIRAL PUTATIF DU VHC.....	48
FIGURE 11. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ENTREE DU VHC DANS SES CELLULES CIBLES.....	49
FIGURE 12. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DES GLYCOPROTEINES D'ENVELOPPE DU VHC.....	54
FIGURE 13. ORGANISATION DE LA TETRASPANINE CD81.....	60
FIGURE 14. LA STRUCTURE DE LA PROTEINE SR-BI.....	67
FIGURE 15. LA STRUCTURE DES CLAUDINES, PROTEINES DE JONCTIONS SERREES.....	69
FIGURE 16. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PARENCHYME HEPATIQUE.....	72
FIGURE 17. VOIES D'ENDOCYTOSE EMPRUNTEES PAR LES VIRUS.....	74
FIGURE 18. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES TETRASPANINES DE MAMMIFERES.....	77
FIGURE 19. L'ORGANISATION DU RESEAU DE TETRASPANINES A LA SURFACE CELLULAIRE SELON LE DETERGENT UTILISE POUR LYSER LES CELLULES.....	81
FIGURE 20. SCHEMA DE RECONNAISSANCE DE LA CD81 MURINE PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX MT81 ET MT81W.....	84
FIGURE 21. MODELE D'ASSEMBLAGE DES PLAQUES UROTHELIALES.....	86
FIGURE 22. LES PROTEINES PARTENAIRES DE LA FAMILLE EWI.....	89
FIGURE 23. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE VIRAL DU VIH.....	108
FIGURE 24. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PARTICULE VIRALE DU VIH.....	108
FIGURE 25. RESUME DE LA PARTICIPATION DES TETRASPANINES DANS L'INFECTION DES MACROPHAGES PAR LE VIH.....	109
FIGURE 26. RESUME DE LA PARTICIPATION DES TETRASPANINES DANS L'INFECTION DE CELLULES DENDRITIQUES PAR LE VIH.....	110
FIGURE 27. RESUME DE LA PARTICIPATION DES TETRASPANINES DANS L'INFECTION DE LYMPHOCYTES T PAR LE VIH.....	111
FIGURE 28. LE CYCLE DE VIE DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	113
FIGURE 29. LE PROCESSUS D'INFECTION DES HEPATOCYTES PAR LES SPOROZOÏTES DE <i>PLASMODIUM</i>	114
FIGURE 30. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ENTREE DU VHC DANS SES CELLULES CIBLES AVEC LES MOLECULES INFLUENÇANT L'ENTREE VIRALE.....	183
FIGURE 31. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ENTREE DU VHC DANS LES HEPATOCYTES POLARISES.....	184
TABLEAU 1. PARTENAIRES MOLECULAIRES CONNUS DES TETRASPANINES.....	86

Liste des abréviations

3'NC – extrémité 3' non codante
5'NC – extrémité 5' non codante
ADNc – ADN complémentaire
ALAT – alanine amino-transférase, transaminase hépatique
ASAT – aspartate amino-transférase, transaminase hépatique
ARFP – protéine F issue d'un cadre alternatif de lecture (de l'anglais *Alternating Reading Frame Protein*)
BCR – récepteur des cellules B (de l'anglais *B cell receptor*)
CSP – protéine circumsporozoïte du parasite *Plasmodium* (de l'anglais *circumsporozoite protein*)
CDV – virus de la maladie de Carré (de l'anglais *canine distemper virus*)
C-terminal – carboxy-terminal
CLDN-1, -6, -9 – protéine des jonctions serrées, claudine-1, -6 et -9
CLDNs – les claudines -1, -6 et -9
DARC – récepteur de chemokines (de l'anglais *duffy antigen receptor for chemokines*)
DC-SIGN – lectine de type C (de l'anglais *dendritic cell specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*)
EIAs – essais immunoenzymatiques (de l'anglais *enzyme immunoassays*)
Endo-H - enzyme endoglycosidase H
EGF – facteur de croissance épidermique (de l'anglais *epidermal growth factor*)
EST – banque de séquences (de l'anglais *Expressed sequence tag*)
ERM – protéines Ezrine, Radixine et Moesine
ffu – unité formant des foyers (de l'anglais *forming foci unit*)
GAG – glycosaminoglycanes
GDD – motif Gly-Asp-Asp, caractéristique des ARN polymérase ARN-dépendantes
GFP – protéine verte fluorescente (de l'anglais *green fluorescent protein*)
GL – gouttelettes lipidiques
HB-EGF – facteur de croissance épidermique lié à l'héparine (de l'anglais *heparin-binding epidermal growth factor*)
HDL – lipoprotéines de haute densité (de l'anglais *high density lipoproteins*)
HTLV-1 – virus de la leucémie humaine de cellules T (de l'anglais *human T-cell leukemia virus*)
HSP – protéine de choc thermique (de l'anglais *heat shock protein*)
HVR – région hypervariable 1, 2 et 3 (de l'anglais *hypervariable region*)
IFN-(α , γ) - interféron α , γ
Ig - immunoglobuline
IRES – site interne d'entrée des ribosomes (de l'anglais *internal ribosome entry site*)
ISG – gènes stimulés par interféron (de l'anglais *interferon-stimulated genes*)
JFH-1 – de l'anglais *Japanese Fulminant Hepatitis*, génome du VHC de génotype 2a
LDL – lipoprotéines de faible densité (de l'anglais *low density lipoproteins*)
LDL-R – récepteur aux lipoprotéines de faible densité (de l'anglais *LDL-receptor*)
LEL – large boucle extracellulaire de la tétraspanine CD81 (de l'anglais *large extracellular loop*)
LPL – Lipoprotéine lipase
L-SIGN – lectine de type C (de l'anglais *liver/lymph node specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*)
M β CB – méthyl- β -cyclodextrine
MHC-I et -II – complexes majeurs d'histocompatibilité (de l'anglais *major histocompatibility complex*)
MLV – virus de la leucémie murine (de l'anglais *murine leukemia virus*)

MT81w – anticorps monoclonal de rat anti-souris CD81, qui reconnaît cette molécule uniquement lorsqu'elle est associée à la toile de tétraspanines
 MTP – protéine de transfert microsomal
 NK – cellules *Natural Killer*, composantes du système immunitaire inné
 N-terminal – amino-terminal
 NS – protéines non-structurales du virus de l'hépatite C
 OMS – Organisation Mondiale de la Santé
 ORF – cadre ouvert de lecture (de l'anglais *open reading frame*)
 PBMC – cellules mononucléaires du sang périphérique (de l'anglais *peripheral blood mononuclear cells*)
 PKA – protéine kinase A
 PKC – protéine kinase C
 RE – réticulum endoplasmique
 RFLP – identification de variantes génétiques par l'utilisation d'enzymes de restriction formant des fragments avec des tailles différentes selon les géotypes et sous-types du VHC (de l'anglais *restriction fragment length polymorphism*)
 RT-PCR – transcription reverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase (de l'anglais *reverse transcription - polymerase chain reaction*)
 SAA – lipoprotéine serum amyloïde A
 SCID - immunodéficience sévère combinée (de l'anglais *severe combined immunodeficiency*)
 sE2 – ectodomaine soluble de la glycoprotéine E2 du VHC
 SEL – petite boucle extracellulaire de la tétraspanine CD81 (de l'anglais *small extracellular loop*)
 Smase – enzyme sphingomyélinase
 SPP – peptidase de peptide signal, enzyme cellulaire qui clive la protéine de capsid (de l'anglais *signal peptide peptidase*)
 SR-BI – scavenger récepteur de classe B type I
 SV40 – virus simien 40 (de l'anglais *simian virus 40*)
 TCR – récepteur de cellules T (de l'anglais *T cell receptor*)
 TEM – microdomaines enrichis en tétraspanines (de l'anglais *tetraspanin enriched microdomains*)
 TGF- α - facteur α de croissance de tumeur (de l'anglais *tumor growth factor- α*)
 Th – lymphocyte T auxiliaire (de l'anglais *T helper*)
 TIMP-1 – protéine inhibitrice des métalloprotéases (de l'anglais *tissue inhibitor of metalloproteinases*)
 TLR – récepteurs *toll-like* (de l'anglais *toll-like receptors*)
 TMD – domaine transmembranaire (de l'anglais *transmembrane domain*)
 TRAP – protéine anonyme associée à la thrombospondine, du parasite *Plasmodium* (de l'anglais *thrombospondin-related anonymous protein*)
 VCAM-1 - molécule vasculaire d'adhésion cellulaire-1 (de l'anglais *vascular cell-adhesion molecule*)
 VIF – virus de l'immunodéficience féline
 VHC – virus de l'hépatite C
 VHCcc – VHC produit en culture cellulaire
 VHCpp – particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe du VHC
 VIH – virus de l'immunodéficience humaine
 VLDL – lipoprotéines de très faible densité (de l'anglais *very low density lipoproteins*)
 VLP – particules ressemblant au VHC (de l'anglais *virus-like particles*)

INTRODUCTION

I. L'Hépatite C

1. La découverte de l'agent responsable de la maladie

Pendant les années 70, l'incidence des hépatites A et B post-transfusionnelles était en baisse due aux mesures de prévention, néanmoins un grand nombre de cas ne présentant aucun marqueur sérologique spécifique aux virus hépatotropes connus à l'époque était encore détecté. Pour cela, l'expression « hépatite post-transfusionnelle non-A non-B » a été proposée afin de décrire une forme d'hépatite qui n'était pas liée aux infections par le virus de l'hépatite A ni celui de l'hépatite B (Lemon, 2007). La première référence à un virus pouvant être l'agent étiologique de ces hépatites post-transfusionnelles non-A non-B a été publiée en 1974 (Prince et al., 1974). La nature virale de l'agent infectieux a été finalement établie à la fin des années 70 grâce à des études d'infection expérimentale de chimpanzés (Alter et al., 1978a; Bradley et al., 1981; Tabor et al., 1978). Avec le succès de ces infections, Choo et collaborateurs ont décrit le clonage moléculaire d'une souche virale isolée à partir d'un chimpanzé infecté (Choo et al., 1989). Leur étude a permis d'identifier les caractéristiques moléculaires de l'agent infectieux viral, sans que celui-ci n'ait été isolé ou cultivé. Ce virus a été appelé Virus de l'Hépatite C (VHC) et la maladie qu'il cause, Hépatite C.

2. L'épidémiologie

2.1. La prévalence de l'infection à travers le monde

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 2,2% de la population mondiale, soit 130 millions d'individus, sont infectés par le VHC (Lemon, 2007). L'hépatite C est une maladie chronique grave avec une prévalence variable d'un continent à l'autre. Dans les pays développés, les taux de prévalence des anticorps anti-VHC sont généralement inférieurs à 2%. La France, par exemple, présente une prévalence estimée à 1% de la population générale (Bastie et al., 1995; Dubois et al., 1997; Martinot-Peignoux et al., 1999; Payan et al., 2005). Par contre, dans certains pays, comme l'Égypte (Memon and Memon, 2002) ou certaines régions de l'Italie (Raffaele et al., 2001), la prévalence peut atteindre 20% (Figure 1).

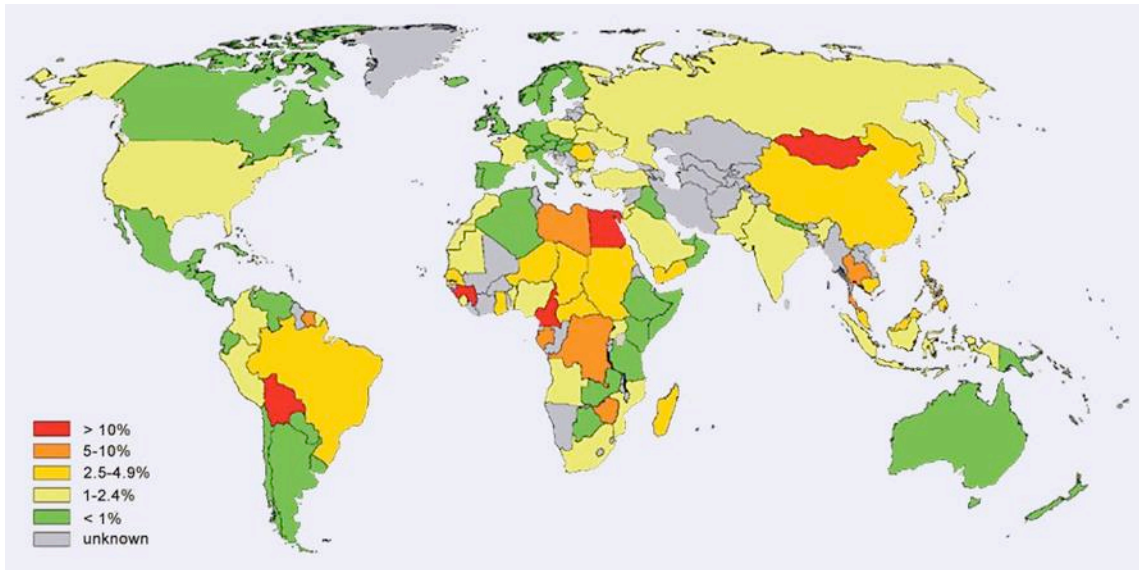


Figure 1. La prévalence du VHC à travers le monde.
(d'après WHO, *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2002).

2.2. Les modes de contamination

La transmission du VHC est essentiellement parentérale. Avant le développement des tests sérologiques pour le tri des donneurs de sang, les transfusions de sang et de ses dérivés, ainsi que la transplantation d'organes, étaient les principales voies de transmission du VHC. Actuellement, dans les pays développés, la majorité des cas sont associés à la toxicomanie intraveineuse (Lemon, 2007). En effet, la prévalence des anticorps anti-VHC varie de 30% à 98% dans la population toxicomane européenne (Roy et al., 2002). L'incidence annuelle de contamination entre les toxicomanes par voie intraveineuse varie entre 15% et 30%. Par contre, dans la population générale la moyenne d'incidence de séroconversion anti-VHC à partir d'une exposition accidentelle au sang contaminé est de 1,8%. Chez les professionnels de la santé, ce taux n'est pas très différent, il varie de 1% à 2% (Lemon, 2007).

Dans les pays en développement, plusieurs cas d'infection sont corrélés à des injections thérapeutiques et aux transfusions de sang réalisées dans des mauvaises conditions d'asepsie. D'autres pratiques, telles que l'acupuncture, le tatouage ou le piercing, peuvent également représenter un risque de transmission si elles ne sont pas réalisées dans de bonnes conditions d'asepsie (Lemon, 2007). En effet, la contamination nosocomiale relève essentiellement de l'utilisation de matériel mal désinfecté. Les transmissions par voie périnatale, sexuelle ou familiale sont relativement peu fréquentes (Lemon, 2007). Il est à noter que pour 30 à 40% des personnes infectées, aucune voie de contamination n'a été identifiée.

3. Les techniques de diagnostic

Le sérum ou plasma des patients est utilisé pour le diagnostic de l'infection par le VHC. Celui-ci est réalisé par des techniques sérologiques, de détection d'anticorps dirigés contre les protéines virales, et par des techniques de biologie moléculaire, de détection d'acides nucléiques viraux. Les tests sérologiques utilisés sont des tests immunoenzymatiques (EIAs), basés sur la technique d'immunoblot ou sur la détection d'anticorps spécifiques contre les différents génotypes du virus (Pawlotsky, 1999). Ces anticorps sont les marqueurs indirects d'une infection par le VHC et sont détectables à partir de sept ou huit semaines après l'infection. Il existe différents tests commerciaux de ce type, basés sur la détection d'anticorps dirigés contre différentes protéines virales (capside, NS4 et NS5, principalement) (Berenguer, 2002). Ces tests sont très sensibles et permettent l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. En général, les résultats positifs doivent être confirmés par la détection du génome viral.

L'ARN génomique est le marqueur qui apparaît le plus rapidement après la contamination. Les tests moléculaires pour la détection du génome ARN du VHC sont très importants pour le diagnostic des cas d'hépatite aiguë, mais aussi pour la confirmation d'une hépatite chronique après détection d'anticorps anti-VHC et pour contrôler la réponse à une thérapie antivirale. Ces tests sont également réalisés en cas d'exposition du personnel soignant au sang et pour la démonstration d'une transmission périnatale du VHC (Pawlotsky, 2002). Les méthodes de biologie moléculaire incluent des tests qualitatifs pour la détection de l'ARN viral présent dans les fluides corporels, et des tests quantitatifs pour la détermination de la charge virale. Ces derniers sont importants pour la détermination indirecte du niveau de répllication virale dans le foie (Lemon, 2007). Différentes techniques de détection de l'ARN génomique sont utilisées, comme la RT-PCR (transcription reverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase). Cependant, l'utilisation clinique des tests quantitatifs est réservée au suivi de la réponse à une thérapie antivirale.

En plus de la détection et quantification de l'ARN viral, des techniques moléculaires sont disponibles pour déterminer le génotype du VHC, notamment chez les patients candidats à une thérapie antivirale. Il existe des techniques de séquençage direct de la région 5' non codante du génome et d'amplification de séquences codantes de la protéine de capside avec des oligonucléotides spécifiques pour les différents génotypes (Lemon, 2007). Une autre technique utilisée est l'identification de variants génétiques par l'utilisation d'enzymes de restriction, qui génèrent des fragments de tailles différentes selon les génotypes et sous-types (RFLP – polymorphisme de fragments d'enzymes de restriction) (Anderson et al., 2003; Thiers et al., 1997).

4. La pathogénèse de l'infection

Le foie est l'organe majeur de réplication du VHC. Dans les tissus collectés de patients infectés, entre 5 à 50% des hépatocytes présentent de l'ARN viral et des protéines virales (Nouri-Aria et al., 1995; Pal et al., 2006). Chez quelques patients, presque toutes les cellules hépatocytaires contiennent de l'ARN. Cependant, certaines études montrent que la présence du virus n'est pas limitée aux hépatocytes et que l'ARN et les antigènes peuvent être détectés dans les cellules mononuclées, dans l'épithélium biliaire, dans les cellules sinusoides et dans l'épithélium intestinal (Deforges et al., 2004; Nouri-Aria et al., 1995; Pal et al., 2006). L'ARN du VHC est détecté par RT-PCR dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), les ganglions, la rate, le cerveau, le pancréas, la moelle épinière, les glandes surrénales et la thyroïde (Forton et al., 2004; Lerat et al., 1998). Par contre, il n'est pas connu si le virus se réplique réellement dans ces tissus. En culture cellulaire, il a été montré que le VHC est capable de se répliquer dans les cellules lymphoïdes (Sung et al., 2003), avec la sélection de mutations d'adaptation (Lerat et al., 2000).

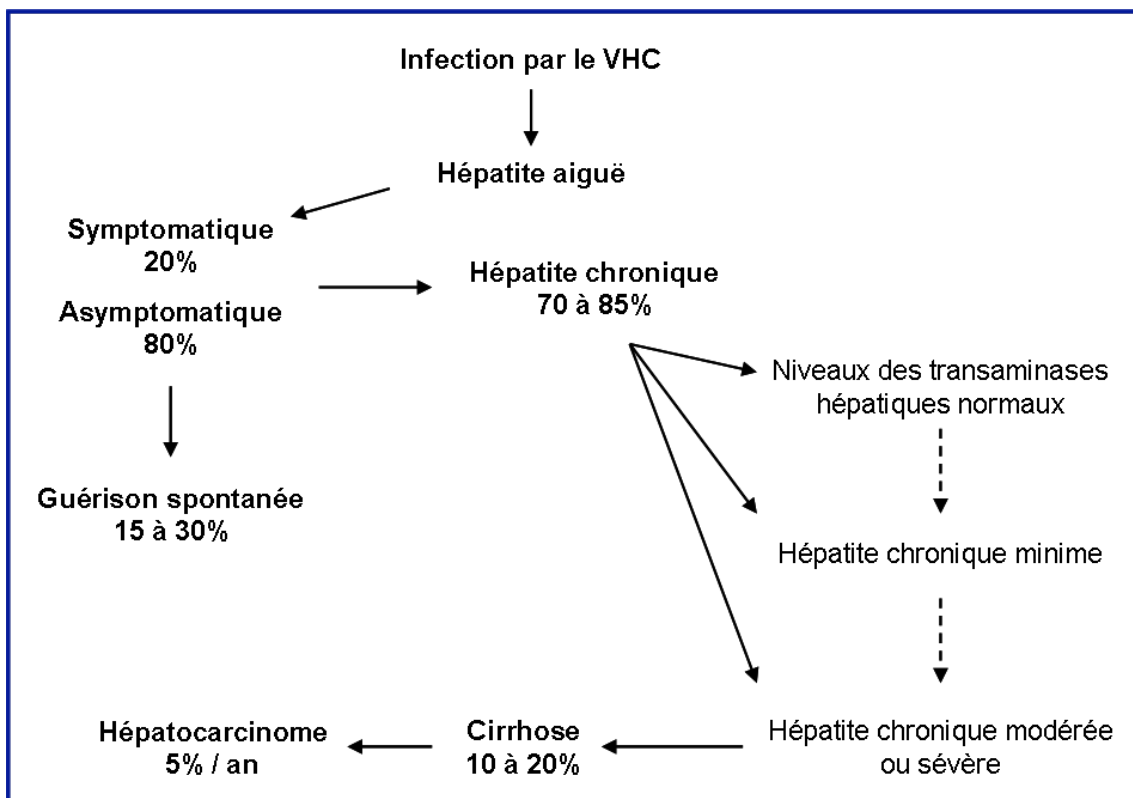


Figure 2. Pathogénèse du VHC.

4.1. L'évolution de la maladie et les symptômes cliniques

L'hépatite C est une maladie progressive, la phase aiguë évolue vers une maladie chronique. A plus long terme, l'hépatite chronique peut causer une cirrhose et un hépatocarcinome (Figure 2). Plusieurs études ont montré que l'évolution chronique de cette

maladie est fortement influencée par de nombreux facteurs, comme l'âge, le sexe, la consommation d'alcool ou la co-infection avec le virus de l'hépatite B ou avec celui de l'immunodéficience humaine (VIH) (Lemon, 2007). Par ailleurs, toute affection hépatique préexistante est aggravée par l'hépatite C. Ainsi, par exemple, le cancer hépatique progresse plus rapidement chez les individus atteints d'une hépatite alcoolique et également porteurs du VHC (Lemon, 2007).

4.1.1. L'hépatite C aiguë

Après contamination par le VHC, le patient va développer une hépatite aiguë qui est le plus souvent asymptomatique et rarement diagnostiquée. La période d'incubation, établie par des études réalisées avec des patients infectés par transfusions sanguines, varie entre 2 et 26 semaines, avec une moyenne de 7 semaines (Lemon, 2007). Bien que la plupart des cas soit asymptomatique, environ 20% des patients développent des symptômes caractéristiques d'une hépatite virale aiguë, tels que la fatigue, des nausées, des douleurs, une urine noircie ou un ictère. Ce tableau clinique est associé à une élévation des transaminases hépatiques (ASAT, ALAT), souvent supérieures à 10 fois les valeurs normales, suivie d'une séroconversion (Lemon, 2007).

Des études indiquent que de 15% à 30% des cas d'hépatite aiguë guérissent spontanément. Les cas d'hépatites fulminantes sont extrêmement rares. La plupart des individus infectés (de 70% à 85%) développent une virémie persistante, presque toujours asymptomatique. L'évolution vers la chronicité n'est pas toujours associée à une élévation des transaminases hépatiques ou à des dommages du tissu hépatique (Lemon, 2007).

4.1.2. L'hépatite C chronique

Le passage de l'hépatite aiguë à une maladie chronique dépend d'un certain nombre de facteurs, comme par exemple l'âge et le sexe masculin. D'autres facteurs, viraux, génétiques ou immunitaires, pourraient également jouer un rôle important. L'infection chronique se caractérise par la persistance de la réplication virale avec une présence durable de l'ARN viral dans le sérum.

De la même manière que l'hépatite aiguë, la forme chronique ne présente pas de symptômes spécifiques. Le plus souvent, l'individu manifeste une fatigue persistante et invalidante, mais les symptômes de la maladie hépatique n'apparaissent en général qu'après quelques décennies (Lemon, 2007). Malgré cela, la plupart des porteurs chroniques présentent des anomalies histologiques. Le stade de l'infection est normalement défini par une biopsie du foie, qui établit la gravité de l'atteinte du tissu hépatique, allant de l'inflammation vers la stéatose, la fibrose, puis la cirrhose, pour finir par le cancer. Les patients présentant une atteinte hépatique significative peuvent développer des complications graves. Néanmoins, le pronostic est difficile à prédire. L'hépatocarcinome, par

exemple, est une complication tardive, apparaissant souvent à l'issue d'une cirrhose et se produisant typiquement après deux ou trois décennies d'infection persistante (Lemon, 2007)). L'OMS estime qu'entre 10 et 20% des porteurs chroniques développent une cirrhose, qui évolue en carcinome hépatocellulaire avec un taux de 5% de cas par an (OMS 2000).

Des évidences épidémiologiques fortes associent l'infection par le VHC au développement d'un hépatocarcinome. Néanmoins, comme tous les virus à ARN, le VHC se réplique exclusivement dans le cytoplasme, n'ayant aucun potentiel d'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire (Lemon, 2007). Ceci suggère que des mécanismes indirects contribuent au développement du cancer, incluant probablement l'état de cirrhose et d'inflammation prolongée, associés à un stress oxydatif avec un potentiel de dommage à l'ADN (Okuda et al., 2002). De plus, il a été montré que certaines protéines du VHC pourraient être oncogènes. Par exemple, des souris transgéniques exprimant le gène de la capsid du VHC développent non seulement une stéatose, mais également un cancer hépatique (Moriya et al., 1998; Moriya et al., 2001). Cette protéine semble d'ailleurs moduler l'action régulatrice de transcription de la protéine p53 (Kao et al., 2004; Otsuka et al., 2000). D'autres protéines virales, notamment les protéines non structurales, pourraient être oncogènes (Lerat et al., 2002). Il a été en effet montré que NS3, NS5A et NS5B affectent la prolifération cellulaire (Lemon, 2007).

4.1.3. Les manifestations extra-hépatiques

Le VHC a été associé à plusieurs symptômes extrahépatiques, souvent d'origine immunologique (pour revue (Galossi et al., 2007)). La cryoglobulinémie est la principale, présente chez 36 à 54% des patients chroniques selon l'étude. Cette maladie est caractérisée par la présence de cryoglobulines, des immunoglobulines (Ig) anormales qui précipitent lors d'une exposition au froid. Elle est parfois associée à des problèmes rénaux (glomérulonéphrites), cutanés (purpura - lésion hémorragique au niveau de la peau ou des muqueuses), articulaires, ainsi qu'à certaines manifestations neurologiques (pour revue (Lemon, 2007; Saadoun et al., 2007; Sansonno et al., 2007)). Par ailleurs, le traitement de base contre le VHC, l'interféron- α (IFN- α), est potentiellement inducteur d'auto-immunité et peut aggraver certaines pathologies. Néanmoins, le nombre réduit d'individus infectés développant des manifestations auto-immunitaires, suggère que l'auto-immunité serait restreinte à un sous-groupe de patients prédisposés (Guadalupe Ercilla and Vinas, 2000).

4.2. La réponse immunologique de l'hôte et la persistance virale

La qualité de la réponse immunitaire est essentielle pour l'élimination ou la persistance de l'infection par le VHC (**Figure 3**). L'élimination des antigènes viraux exige l'activation des réponses immunitaires humorale (les lymphocytes B) et cellulaire

(les lymphocytes T). Les lymphocytes T auxiliaires (Th) CD4+ jouent un rôle important dans les fonctions immunorégulatrices à travers la modulation de la différenciation des lymphocytes B et de l'activation des lymphocytes T cytotoxiques CD8+. Certains groupes de cellules Th CD4+, qui produisent de l'IFN- γ , participent à la défense contre les parasites intracellulaires, comme les virus, et stimulent l'action de cellules T cytotoxiques CD8+. Ces dernières détruisent les cellules infectées par des virus.

Jusqu'à présent, les déterminants de l'immunité contre le VHC demeurent inconnus, néanmoins les études sur des chimpanzés et des humains présentant une guérison spontanée ont montré que la clairance virale est associée à une réponse T CD8+ forte et durable, ciblant plusieurs épitopes du VHC (Bowen and Walker, 2005; Racanelli and Manigold, 2007). La reconnaissance des épitopes par les complexes majeurs d'histocompatibilité, les MHC-I et II, a permis leur identification. Les plus fréquents sont présents dans les protéines de capsid et les protéines non structurales (Day et al., 2002; Gerlach et al., 2005; Penna et al., 2002; Schirren et al., 2000; Schulze zur Wiesch et al., 2005). Néanmoins, il n'est pas encore établi si cette reconnaissance est liée à une présentation préférentielle par les cellules présentatrices d'antigènes de ces protéines, par rapport aux protéines d'enveloppe qui sont plus variables (Lemon, 2007).

La clairance du VHC est également associée à une réponse T CD4+ élevée. En effet, les individus séropositifs sains présentent des réponses plus fortes que celles des patients avec une hépatite chronique. Inversement, l'hépatite chronique est associée à des réponses T CD4+ faibles (**Figure 3**) (Botarelli et al., 1993; Valiante et al., 2000). Néanmoins, une réponse forte ne signifie pas forcément l'élimination du virus. De plus, les individus et les chimpanzés qui ont guéri, présentent un grand nombre de cellules de mémoire T CD4+ et CD8+ (Bassett et al., 2001; Day et al., 2002; Day et al., 2003; Lauer et al., 2004; Major et al., 2002; Shoukry et al., 2003; Shoukry et al., 2004; Takaki et al., 2000). D'un autre côté, les individus et les chimpanzés qui présentent une absence de cellules T spécifiques du virus possèdent un plus grand risque de développer une maladie chronique (Cooper et al., 1999; Gerlach et al., 1999; Gruner et al., 2000; Lauer et al., 2002; Thimme et al., 2002; Thimme et al., 2001).

La plupart des individus infectés par le VHC développent des réponses T CD4+ et T CD8+ pendant la phase aiguë de la maladie, mais elles sont anormalement lentes, même lorsqu'il y a guérison spontanée (**Figure 3**) (Lemon, 2007). Dans ce sens, il a été montré que durant l'infection primaire de chimpanzés, les cellules T CD8+ spécifiques contre le VHC apparaissent relativement tard, elles sont détectables de 5 à 10 semaines après l'infection (Cooper et al., 1999; Lechner et al., 2000; Shoukry et al., 2003; Thimme et al., 2002; Urbani et al., 2005). Ce qui suggère que les antigènes du VHC ne sont pas accessibles au système immunitaire et ne sont pas présentés aux cellules T pendant presque deux mois. Le système

immunitaire pourrait ne pas « sentir » les virus jusqu'à ce que l'infection soit relativement avancée (Racanelli and Manigold, 2007; Racanelli and Rehermann, 2003).

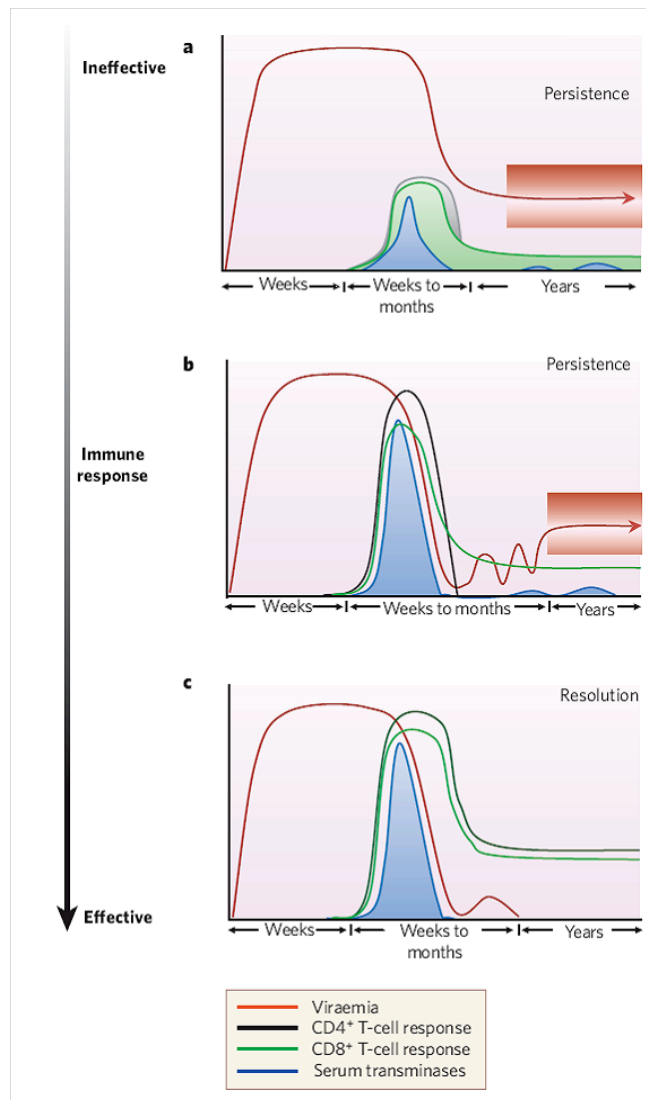


Figure 3. Représentation schématique de la réponse immunitaire cellulaire au cours de l'infection aiguë par le VHC.

(d'après Bowen & Walker, *Nature* 2005) **A)** La virémie (en rouge) est présente rapidement et, bien qu'elle diminue après le pic, n'est jamais contrôlée. Il s'ensuit l'établissement d'une infection chronique avec une virémie variable chez les différents patients. Dans ces conditions, les réponses CD4+ et CD8+ (en noir et en vert, respectivement) ainsi que le niveau des transaminases sériques (en bleu) évoluent peu et peuvent être faibles voire absentes. **B)** La virémie persiste pendant plusieurs semaines en absence de réponse immunitaire cellulaire détectable. L'apparition des réponses CD4+ et CD8+ est associée à un contrôle temporaire de la virémie ainsi qu'à des variations du niveau des transaminases sériques. Toutefois, après la chute de la réponse CD4+, la virémie réapparaît et devient persistante. Une réponse CD8+ peut rester détectable malgré l'infection chronique. **C)** Bien que la virémie apparaisse rapidement et que les réponses cellulaires apparaissent tardivement, le virus devient indétectable dans le plasma après l'apparition des cellules CD4+ et CD8+ qui coïncide souvent avec un niveau de transaminases sériques variable. Un rebond de la virémie peut avoir lieu avant la clairance virale.

Les lymphocytes T CD8+ sont, par ailleurs, spécialement présents dans le foie des porteurs chroniques (**Figure 3**) (Erickson et al., 1993; Erickson et al., 2001; Grabowska et al., 2001; He et al., 1999; Koziel et al., 1993; Koziel et al., 1992; Nelson et al., 1998; Spangenberg et al., 2005; Wong et al., 1998; Wong et al., 2001). Cependant, ils ne sont probablement pas complètement fonctionnels (Appay et al., 2002; Gruener et al., 2001; Lucas et al., 2004; Wedemeyer et al., 2002). De plus, il a été montré que la protéine de capsid possède un rôle suppresseur immunitaire sur la prolifération des cellules T et probablement sur leur différenciation (Accapezzato et al., 2004; Hahn, 2003). L'expression de la capsid pourrait également augmenter la résistance des hépatocytes à la cytolysé médiée par les cellules T, le principal mécanisme de mort cellulaire dans le foie (Disson et al., 2004; Kamegaya et al., 2005; Yin and Ding, 2003).

La persistance de l'infection par le VHC a également été associée à une altération de l'activité des cellules *Natural Killer* (NK). En effet, chez les patients présentant une maladie chronique les niveaux d'expression de récepteurs des cellules NK sont réduits. Inversement, chez les patients qui ont réussi à éliminer le virus par la thérapie antivirale, les niveaux d'expression étaient comparables à ceux observés chez les individus sains (Nattermann et al., 2006). De plus, il a été montré qu'en interagissant avec la protéine CD81, la protéine d'enveloppe E2 du VHC est capable de bloquer l'activation des cellules NK et d'inhiber la production d'IFN- γ par ces cellules (Crotta et al., 2002; Tseng and Klimpel, 2002). Toutefois, la persistance de l'infection n'a pas encore été corrélée à une activité cytotoxique défectueuse ou à une production d'IFN- γ déficiente par ces cellules (Golden-Mason and Rosen, 2006; Koziel, 2006).

Pour que les lymphocytes T puissent reconnaître et répondre spécifiquement à un antigène ils doivent être stimulés par d'autres cellules, les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques et les phagocytes mononucléaires. Bien que les cellules dendritiques soient permissives à l'infection par plusieurs virus, leur capacité à supporter la réplication du génome viral est souvent inférieure à celle d'autres types cellulaires. Ceci suggère que l'importance de l'infection de ces cellules par les virus est plutôt de cibler les fonctions de présentation d'antigènes que de produire de nouveaux virus (Pachiadakis et al., 2005). En ce qui concerne le VHC, il a été montré que des patients peuvent présenter des monocytes et des PBMC infectés (Lerat et al., 1998; Muratori et al., 1996). Certaines études ont détecté le génome du VHC dans des cellules dendritiques, dérivées de monocytes isolés à partir du sang périphérique de patients infectés (Bain et al., 2001; Navas et al., 2002). D'autres ont montré que les porteurs chroniques possèdent un nombre réduit de cellules dendritiques, qui parfois présentent des déficiences fonctionnelles, pouvant causer une mauvaise présentation d'antigènes aux cellules T (Golden-Mason and Rosen, 2006; Pachiadakis et al., 2005).

Les lymphocytes B, les cellules productrices d'anticorps, peuvent également être stimulés directement par des antigènes viraux. D'ailleurs, la cryoglobulinémie associée au VHC peut évoluer vers un lymphome Non-Hodgkinien de cellules B. D'autre part, l'infection par le VHC entraîne la production d'anticorps dirigés contre les protéines virales chez la majorité des patients chroniquement infectés. Des anticorps neutralisants ont d'ailleurs été détectés dans les sérums de patients infectés, les principales cibles étant la protéine d'enveloppe E2 présente à la surface de la particule virale (Bartosch et al., 2003a; Farci et al., 1994; Hsu et al., 2003; Lavillette et al., 2005a; Logvinoff et al., 2004; Meunier et al., 2005; Yu et al., 2004). Des anticorps dirigés contre la région hypervariable 1 (HVR1) de E2 ont montré, par exemple, une activité neutralisante *in vitro* et *in vivo* (Farci et al., 1996; Shimizu et al., 1996). De plus, différentes études suggèrent que chez les patients qui éliminent le virus, la clairance virale est associée à l'induction rapide de la production d'anticorps neutralisants dans la phase précoce de l'infection et/ou à une réduction de la diversification de l'épitope HVR1 (Lavillette et al., 2005a; Mondelli et al., 2003; Pestka et al., 2007). Par contre, le rôle des anticorps neutralisants dans le contrôle de l'infection est remis en question par le fait que la réinfection est possible en leur présence et qu'ils sont également détectés dans les sérums de patients chroniquement infectés (Farci et al., 1992; Lemon, 2007).

Le VHC est également capable de moduler les défenses anti-virales des cellules infectées, c'est à dire les voies de signalisation cellulaires qui mènent à la synthèse d'interférons de type 1 et à d'autres gènes stimulés par l'interféron (ISG), qui ont un potentiel antiviral. Il semblerait que les protéines du VHC, particulièrement NS3/4A, bloquent ces voies de signalisation (Foy et al., 2003; Gale and Foy, 2005; Loo et al., 2006). En effet, la protéase virale NS3/4A bloque les voies de signalisation normalement activées par la présence d'ARN double brin dans le cytoplasme, car elle clive des protéines cellulaires nécessaires à la transduction de signal (Lemon, 2007). Par contre, il n'est pas encore bien établi si cette évasion des voies de signalisation de l'interféron contribue à l'établissement d'une infection persistante (Gale and Foy, 2005). D'autres études suggèrent que les protéines de capsid, E2 et NS5A, pourraient également moduler certaines voies de signalisation (Gale et al., 1997; Heim et al., 1999; Hosui et al., 2003; Miller et al., 2004; Pflugheber et al., 2002). Le réseau de ces interactions contribuerait à l'évasion des réponses antivirales cellulaires, en rendant le virus relativement résistant aux actions antivirales de l'IFN et à d'autres protéines activées par les ARN double brin (Lemon, 2007).

En résumé, pendant la phase aiguë de l'infection, il a été proposé que les anticorps neutralisants, les cellules Th et les cellules cytotoxiques étaient critiques pour la clairance du VHC. Il est probable, que tous ces effecteurs de la réponse immunitaire jouent des rôles majeurs dans la résolution de la maladie. Par contre, pendant la phase chronique, la

situation est différente parce que le virus s'est déjà établi dans l'hôte et continue à survivre aux attaques continues du système immunitaire. Les mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte développés par le VHC demeurent méconnus (Lemon, 2007). Des modèles cellulaires indiquent que certaines protéines virales possèdent des rôles inhibiteurs et suppresseurs des cellules T régulatrices. En effet, la protéine d'enveloppe E2 présentant des variations dans la séquence HVR1 pourrait inhiber les réponses T CD4+ spécifiques contre le virus (Frasca et al., 1999). Par ailleurs, l'introduction de mutations aléatoires dans le génome viral induit l'émergence de variants d'échappement, lorsque elles ont lieu sur des épitopes soumis aux pressions de sélection du système immunitaire (Lemon, 2007). Ces mutations facilitent l'échappement à la reconnaissance de cellules infectées par les cellules T CD8+ (Bowen and Walker, 2005).

Pendant la phase chronique, le génome viral présente une diversification limitée, qui est probablement liée à une génération détériorée de cellules T CD8+ (Lemon, 2007). Des mutations dans leurs épitopes MHC-I sont en effet sélectionnées pendant les infections chez l'homme et chez le chimpanzé (Bowen and Walker, 2005; Cox et al., 2005; Erickson et al., 2001; Ray et al., 2005; Tester et al., 2005; Timm et al., 2004). Néanmoins, quelques populations de cellules T pourraient ne jamais atteindre le seuil nécessaire pour exercer une pression sélective significative (Lemon, 2007). D'autres hypothèses ont été proposées : un haut niveau de réplication du VHC pourrait causer l'épuisement du système immunitaire à travers la production de quantités énormes d'antigènes ; la suppression de l'expansion des cellules Th spécifiques du VHC ; l'induction de l'apoptose des cellules T CD8+ spécifiques dirigées contre le virus ; et l'accumulation de mutations portées par les protéines d'enveloppe (Lemon, 2007). Une autre hypothèse en lien avec les protéines d'enveloppe est que leur niveau de glycosylation pourrait moduler l'immunogénicité des particules virales et ainsi restreindre l'accès des anticorps neutralisants à la surface des virions (Helle et al., 2007).

5. Les traitements

L'importance du génotypage du VHC chez les patients chroniquement infectés vient du fait que, selon le génotype du virus, la durée et la réponse au traitement peuvent varier. Aujourd'hui, le traitement de référence est basé sur l'utilisation de l'IFN- α pégylé associé à la ribavirine, un analogue nucléosidique de la guanosine ayant un effet antiviral sur de nombreux virus. La prévention de l'infection repose uniquement sur la réduction ou l'élimination des risques de transmission, car malheureusement il n'existe pas encore de vaccin contre l'hépatite C.

La durée de la thérapie varie entre 6 et 12 mois selon le génotype viral. En général, les patients chroniquement infectés avec les génotypes 2 et 3 suivent un traitement pendant

6 mois avec une faible dose de ribavirine. Parmi ces patients, de 76% à 82% des individus présentent une réponse virologique prolongée, c'est-à-dire l'absence de détection de l'ARN viral dans le sérum six mois après la fin du traitement. En revanche, seulement 42% à 46% des patients infectés par le génotype 1, traités pendant 12 mois avec une forte dose de ribavirine, possèdent une élimination permanente du virus (Lemon, 2007; Poynard et al., 2003). En plus d'un taux élevé de non-répondeurs, ces traitements sont longs, coûteux et peuvent donner lieu à des effets secondaires non négligeables, tels qu'une neutropénie, une perte de poids, des nausées, un syndrome grippal (fièvre, myalgies, frissons) et un état dépressif. Sans compter qu'ils sont contre-indiqués dans un certain nombre de cas, comme la grossesse, l'insuffisance rénale sévère, l'hépatite auto-immune, entre autres (Fried, 2002). Pour cela, il est essentiel d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de l'hépatite C.

A l'heure actuelle, plusieurs molécules sont en phase clinique. Certaines d'entre elles visent à améliorer le traitement actuel. C'est le cas de l'Albuferon-alpha et de la Viramidine, qui sont en phase III. L'Albuferon-alpha correspond à l'IFN fusionné à l'albumine, ce qui lui confère une demi-vie plus longue que l'IFN pégylé. La Viramidine est un précurseur de la ribavirine avec son effet anti-VHC, mais sans l'effet hémolytique induit par le traitement avec cette molécule. D'autres composants ciblent spécifiquement le virus, ce qui devrait rendre le traitement plus spécifique et moins toxique (De Francesco and Migliaccio, 2005; Huang et al., 2006; Pawlotsky et al., 2007). C'est en effet le cas de la molécule VX-950 (telaprevir), une molécule mimant la région carboxy-terminale (C-terminale) de NS3 et capable de bloquer cette protéase virale. Le telaprevir présente une activité importante dans le système de réplication et il possède des effets antiviraux chez les patients infectés (Forestier et al., 2007; Reesink et al., 2006). De manière intéressante, la combinaison du telaprevir avec de l'IFN- α et de la ribavirine induit un effet antiviral encore plus efficace (Lawitz et al., 2008). Certains patients ont présenté le développement de variants de résistance à la molécule, mais ils demeurent sensibles au traitement avec l'IFN- α et la ribavirine (Lawitz et al., 2008; Sarrazin et al., 2007a).

Plusieurs études ont donné des résultats encourageants quant à l'utilisation de vaccins comme traitement prophylactique contre le VHC. Un essai de vaccination a été réalisé chez le chimpanzé avec des hétérodimères des glycoprotéines virales E1E2 purifiés (Ralston et al., 1993). Cet antigène permettait la production d'anticorps ainsi qu'une réponse immunitaire cellulaire de type Th dirigée contre les protéines d'enveloppe E1 et E2 (Choo et al., 1994). Plusieurs approches de vaccination sont en essai clinique pour une utilisation en complément aux traitements existants (Houghton and Abrignani, 2005). Des données préliminaires suggèrent que la réponse au traitement IFN/ribavirine est étroitement liée à la réponse immunitaire cellulaire (Cramp et al., 2000; Nelson et al., 1998; Vrolijk et al., 2003) et

à la réponse immunitaire humorale, avec des anticorps probablement dirigés contre les protéines d'enveloppe (Baumert et al., 2000). Il semble donc possible d'amplifier la réponse immunitaire par une vaccination appropriée afin d'améliorer le taux de réponse de la thérapie standard. L'utilisation d'un antigène E1 en présence d'un adjuvant à base d'alun permet par exemple d'amplifier les réponses immunitaires humorale et cellulaire dirigées contre E1 chez les patients virémiques (Nevens et al., 2003). En outre, l'anticorps monoclonal humain de haute affinité XTL-002 dirigé contre la glycoprotéine E2 du VHC réduit de manière dose-dépendante les niveaux de VHC sériques dans le système de souris « VHC-Trimera » (Ilan et al., 2002). Chez les patients qui ont reçu une dose intraveineuse de cet anticorps, la charge virale a également été réduite (Bayes et al., 2004).

II. Le virus de l'Hépatite C (VHC)

1. La classification et la variabilité génomique

Le génome du VHC présente des caractéristiques communes à d'autres virus à ARN simple brin de polarité positive. L'analyse des séquences clonées a montré des similitudes avec les virus appartenant aux genres *Flavivirus* (comme les virus de la Fièvre Jaune et de la Dengue) et *Pestivirus* (comme le virus de la Diarrhée Bovine), tous appartenant à la famille des *Flaviviridae* (Miller and Purcell, 1990) (**Figure 4**). Des analyses ultérieures ont permis la classification du VHC dans un genre séparé, l'*Hepacivirus* (Houghton, 1996). Un autre groupe de virus qui appartient à cette famille comprend les agents GB, nommés GBV-A, -B et -C (Karayiannis and McGarvey, 1995). Le GBV-B est un virus hépatotrope qui présente une forte identité de séquence avec le VHC (Ferron et al., 2005).

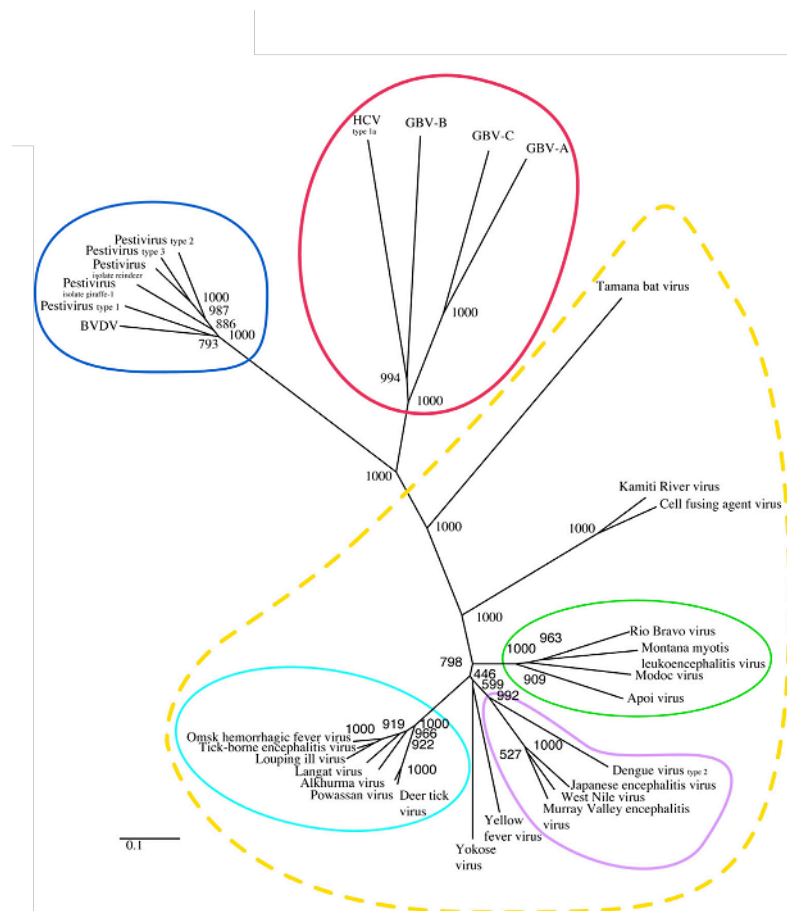


Figure 4. Arbre phylogénétique de la famille des *Flaviviridae*.
(d'après Ferron et al., *BMC Informatics* 2005)

La présence du VHC chez les populations humaines a produit un grand nombre de variants ou génotypes distincts, numérotés de 1 à 6. Chaque génotype possède plusieurs sous-types qui sont désignés par des lettres (Simmonds et al., 1993) (**Figure 5**). Les

génotypes différent entre eux de 31% à 33% au niveau de leurs séquences nucléotidiques. La variation est de 20% entre les sous-types et d'un peu moins de 10% dans chaque sous-type (Pawlotsky, 2003; Simmonds, 1995; Simmonds, 2004).

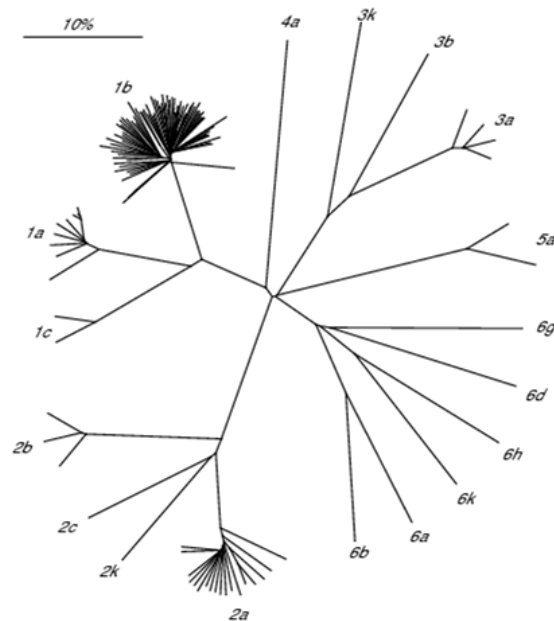


Figure 5. Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences codantes complètes des différents génotypes du VHC.

(d'après la base de données sur le VHC de Los Alamos, Etats-Unis)

1.1. L'émergence et la diversification des génotypes

Cette variabilité génomique est le résultat de l'accumulation de mutations dans le génome pendant le processus de réplication virale. Le VHC, comme les autres virus à ARN, réplique son matériel génétique en utilisant une ARN polymérase ARN-dépendante. Cette enzyme introduit des erreurs au hasard lors de la réplication et, à l'inverse de l'ADN polymérase, elle ne possède pas la capacité de correction de ses erreurs de lecture. En effet, la fréquence d'erreurs de l'ARN polymérase ARN-dépendante du VHC est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} par position nucléotidique (Domingo et al., 2006; Pawlotsky, 2003). Ce qui permet une sélection naturelle rapide des virions adaptés aux nouveaux environnements chez les différents hôtes. Comme la production de particules virales par les cellules infectées est très importante, environ 10^{12} virions par jour (Neumann et al., 1998), les erreurs de réplication s'accumulent et génèrent une diversité génétique au sein de chaque individu infecté, ce qui conduit à l'apparition de quasi-espèces.

Tandis que des mutations resteraient silencieuses par la conservation des mêmes acides aminés, certaines conduiraient à la synthèse de génomes défectifs, produisant des virions non viables. D'autres enfin confèreraient un avantage ou un handicap sélectif selon l'environnement dans lequel le virus évolue. L'accumulation de mutations pourrait aboutir à

des changements de la biologie virale pouvant conduire par exemple à l'augmentation de la sensibilité à la réponse immunitaire ou à l'émergence de virions plus résistants.

1.2. La distribution mondiale des génotypes

Les génotypes du VHC se répartissent d'une façon variée entre les différentes régions géographiques du monde (**Figure 6**). Par exemple, l'Europe et l'Amérique du Nord présentent plusieurs génotypes avec un nombre restreint de sous-types. Dans ces pays, les sous-types 1a, 1b, 2a, 2b et 3a sont les plus fréquents et l'existence d'autres génotypes serait due aux immigrations ou voyages récents dans des pays lointains (Smith and Simmonds, 1997). D'autres régions sont caractérisées par l'existence de plusieurs sous-types d'un seul génotype prédominant. Cela est observé en Guinée pour le génotype 1 ; dans certaines régions de l'Afrique Centrale et de l'Est pour le génotype 2 ; en Inde pour le génotype 3 ; en Afrique Centrale pour le génotype 4 ; et en Asie du Sud-est pour le génotype 6. Une région endémique pour le génotype 5 n'a pas encore été identifiée, mais il est possible qu'elle soit l'Afrique du Sud, parce que c'est le seul endroit où ce génotype est très commun (Smith et al., 1997).

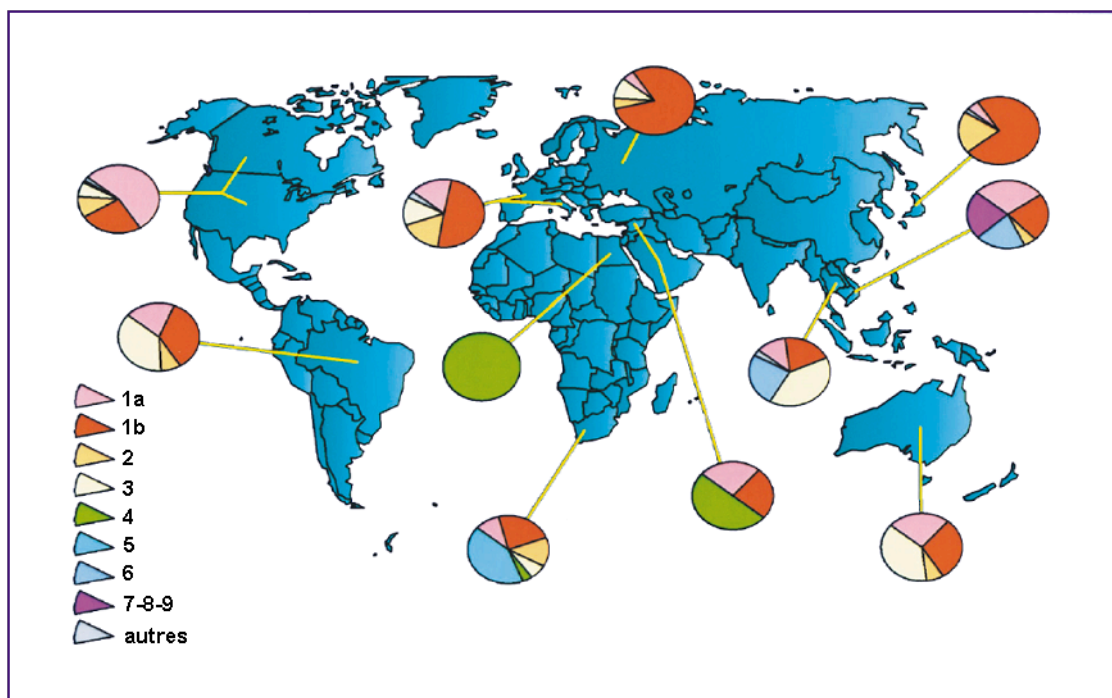


Figure 6. Distribution géographique des différents génotypes du VHC.

(d'après Zein, *Clin. Microbiol. Rev.* 2000)

L'origine de la variation génotypique du VHC est incertaine. Ces variants pourraient être récents, issus d'une dissémination épidémique au travers de nouvelles voies de transmission au sein de la population humaine en croissance ; ou alors, ils pourraient être beaucoup plus anciens, résultant d'une présence continue du virus dans une population

isolée. Des études ont identifié le taux de substitution par site nucléotidique et par an, indiquant qu'un ancêtre commun à tous les génotypes aurait existé il y a environ 500 ans (Smith et al., 1997). Néanmoins, tandis que quelques génotypes sont ubiquitaires, d'autres sont isolés dans des régions géographiques particulières, où une extrême diversité de sous-types existe. Cette distribution est plutôt une conséquence d'une longue période d'infection endémique, pendant laquelle il n'y a pas eu d'échange avec les génotypes d'autres régions. La transmission virale s'est produite continuellement par des voies parentérales issues des pratiques culturelles spécifiques et/ou par des voies verticales, sexuelles et familiales. Le temps de divergence des génotypes du VHC pourrait alors précéder considérablement les voies modernes de transmission parentérale (Smith et al., 1997).

Ainsi, la grande diversité de sous-types d'un seul génotype dans une population donné signale que l'infection est endémique depuis une longue période de temps, pouvant aller de 500 à 2000 ans. Inversement, la grande dissémination d'un génotype avec peu de variété de sous-types, comme le 1b en Europe, met en évidence l'introduction relativement récente de ce variant (Mellor et al., 1995; Smith et al., 1997). Par ailleurs, le fait que les génotypes 1b, 2a et 2b soient présents dans presque toutes les régions du monde pourrait être liée à des interventions médicales, telles que le vaccin contre la fièvre jaune contenant du sérum humain, l'utilisation de seringues non-stérilisées et ré-utilisées pour les injections, la vaccination contre la variole, etc (Smith et al., 1997).

1.3. Les génotypes et la pathogenèse de la maladie

Le rôle des génotypes du VHC dans la progression de la maladie est particulièrement controversé (Zein, 2000). Certaines études suggèrent que le génotype 1b pourrait être associé à une atteinte hépatique plus sévère et à une évolution plus agressive de la maladie que les autres génotypes. Par contre, d'autres études réfutent ces associations. D'une manière générale, le génotype viral ne semble pas influencer le taux de passage à la chronicité, la sévérité des lésions hépatiques ou le développement de manifestations extra-hépatiques. Cependant, la stéatose hépatocytaire est induite directement par le VHC de génotype 3, suggérant que certaines séquences virales induisent l'accumulation intracellulaire de lipides (Hui et al., 2002; Rubbia-Brandt et al., 2004; Rubbia-Brandt et al., 2001; Rubbia-Brandt et al., 2000; Westin et al., 2002). Au cours des infections causées par d'autres génotypes, la stéatose semble être principalement métabolique (Bjornsson and Angulo, 2007; Negro, 2006). Ce dommage tissulaire est marqué par l'accumulation de gouttelettes lipidiques (GL) de plusieurs tailles dans le cytoplasme cellulaire (Moriya et al., 1997). La protéine de capsid, principalement de génotype 3, semble jouer un rôle dans le développement de la stéatose (Barba et al., 1997; Boulant et al., 2006; Hope and McLauchlan, 2000; Rubbia-Brandt et al., 2000) et elle se retrouve à la surface de ces GL

(Hope et al., 2002; Rouille et al., 2006). Il a été montré que son expression dans les cellules hépatocytaires induit la présence de GL présentant un volume significativement plus grand (Piodi et al., 2008). Cette étude a également montré que ces grandes GL sont présentes en plus grand nombre dans les cellules exprimant la protéine de capsid de génotype 3a. Toutefois, Piodi et collaborateurs n'ont pas observé de différences significatives entre les séquences issues de patients infectés par le VHC de ce génotype et présentant ou non une stéatose. Ceci suggère que d'autres protéines virales pourraient agir directement ou moduler la fonction de la protéine de capsid, ou alors que des facteurs de l'hôte détermineraient si la réplication du VHC de génotype 3a déclenche la formation et la croissance des GL (Piodi et al., 2008).

2. Les propriétés biophysiques de la particule virale

Le VHC est un virus enveloppé sphérique de 55 à 65 nm de diamètre (Kaito et al., 1994). Il est constitué d'une nucléocapsid d'environ 30 nm de diamètre et d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 (**Figure 7A**). De nombreuses études ont permis de déterminer que le VHC circule sous différentes formes dans le sang des patients infectés. Ces diverses formes présentent une distribution hétérogène dans un gradient de densité. La plupart des sérums analysés présentent deux populations majeures, les particules de faible (1,03 – 1,08 g/mL) et de haute densité (1,17 – 1,25 g/mL) (Andre et al., 2002; Prince et al., 1996). Les particules de haute densité sont associées à des Ig et sont peu infectieuses (Choo et al., 1995; Hijikata et al., 1993; Maillard et al., 2001). D'un autre côté, celles de faible densité résultent de l'association avec des lipoprotéines de très faible ou de faible densité (VLDL et LDL) (Andre et al., 2002; Monazahian et al., 2000; Nielsen et al., 2006). Il semblerait que les particules les plus infectieuses aient une densité comprise entre 1,09 et 1,11 g/mL (Bradley et al., 1991; Hijikata et al., 1993). Une étude récente a montré que la production virale par les hépatocytes était dépendante de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL, suggérant que les particules du VHC seraient liées ou incorporées aux VLDL durant leur assemblage et seraient ensuite sécrétées avec ces lipoprotéines (Huang et al., 2007). Dans ce sens, il a été montré que les particules du VHC sont assemblées dans un compartiment intracellulaire sous forme de particules de forte densité (> 1,15g/mL), mais qu'elles acquièrent des éléments qui leur confèrent une faible densité (< 1,14g/mL) durant leur sécrétion (Gastaminza et al., 2006). Enfin, une autre étude a décrit une forme de virions de faible densité, nommée lipo-viro-particule (Andre et al., 2002). Ces particules sont riches en triglycérides et contiennent au moins les apolipoprotéines B et E, l'ARN du VHC et la protéine virale de capsid. Elles sont également associées à des IgG et IgM.

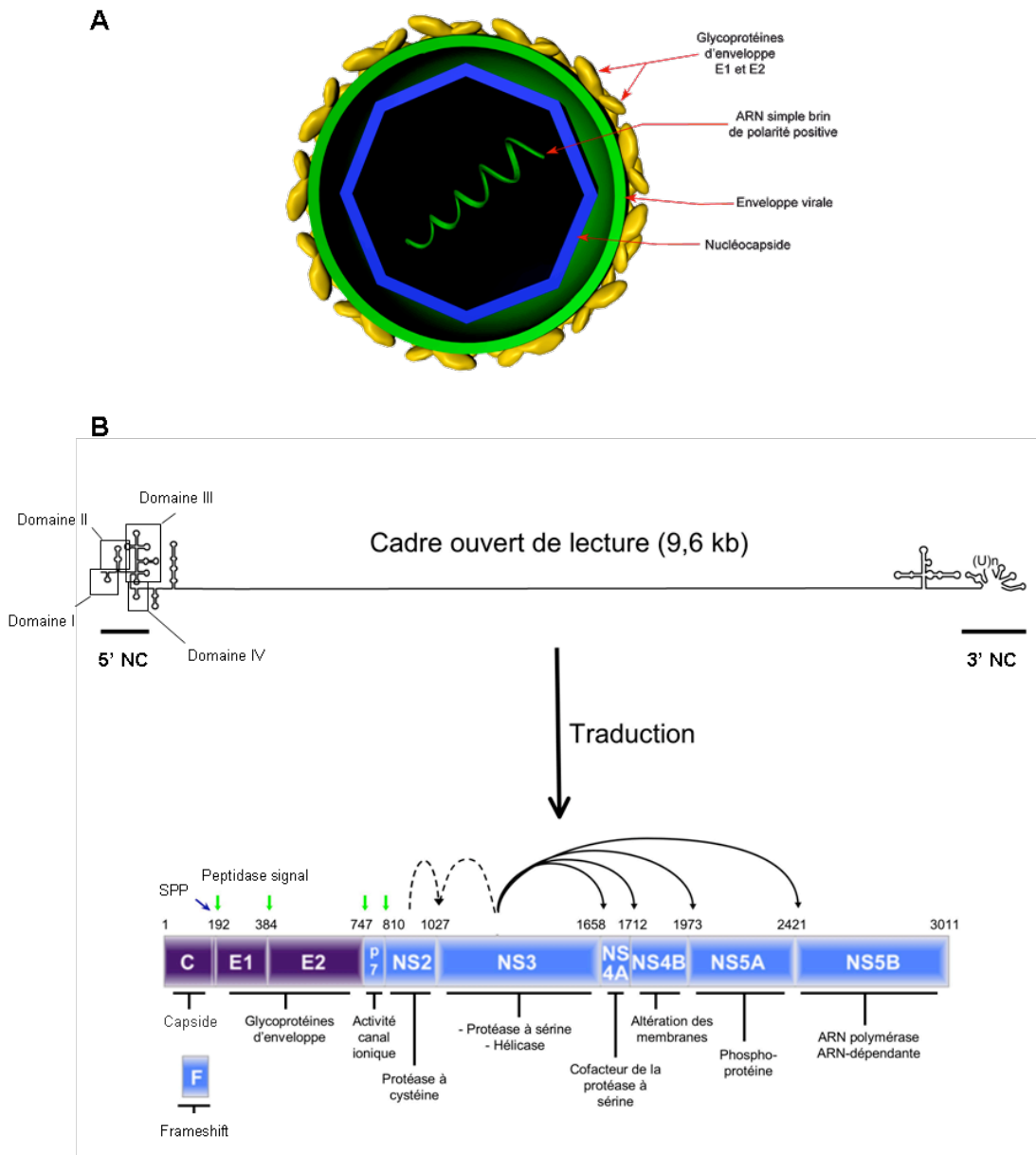


Figure 7. A) Représentation schématique d'une particule du VHC. **B)** Organisation génomique du VHC.

Des études sur l'inactivation des particules virales ont été réalisées au début des années 80, à l'époque où l'hépatite C était encore appelée hépatite non-A non-B. Ces études ont montré que l'agent des hépatites non-A non-B était inactivé par des traitements au chloroforme (Feinstone et al., 1983), à la formaldéhyde au 1/1000 (Yoshizawa et al., 1982), par irradiation avec des rayons ultra-violet (Prince et al., 1985) et par chauffage à 100°C pendant 1 heure (Yoshizawa et al., 1982) ou à 60°C pendant 10 heures (Hollinger et al., 1984). Néanmoins, des études plus approfondies seraient nécessaires pour confirmer les conditions capables d'inactiver ce virus.

3. L'organisation du génome

Le génome du VHC est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive de 9,6kb environ (Choo et al., 1989) avec un cadre ouvert de lecture (ORF), encadré par deux extrémités non-codantes (5'NC et 3'NC). L'ORF code une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés (Reed and Rice, 2000) (**Figure 7B**).

3.1. Les extrémités non codantes

3.1.1. La région 5' non codante

La région 5' non codante (5'NC), importante pour la réplication du génome viral et la traduction des protéines virales, est très conservée parmi les différents isolats du VHC (Honda et al., 1999). Ce segment génomique est essentiel à la traduction de la polyprotéine et à la réplication du génome. Elle est constituée de 341 nucléotides et comporte quatre domaines distincts, de I à IV (**Figure 7B**). Des signaux critiques pour la réplication du génome sont localisés dans les domaines I et II (nucléotides 1 à 115), mais la séquence entière de la région 5'NC est nécessaire à une réplication efficace de l'ARN (Friebe et al., 2001; Kim et al., 2002). Les domaines II à IV (nucléotides 44 à 341) ainsi que le début de la séquence de l'ORF contiennent un site interne d'entrée des ribosomes (IRES). L'IRES est capable de se lier à la sous-unité ribosomal 40S avec une grande affinité et en absence des facteurs de transcription canoniques, d'une manière similaire aux ARN messagers procaryotes (Honda et al., 1996; Pestova et al., 1998). Cette sous-unité ribosomale, associée au facteur de transcription eIF3, se fixe sur la partie basale du domaine III rapprochant ainsi le complexe d'initiation du codon AUG d'initiation qui se trouve au sein du domaine IV (Sarnow, 2003; Siridechadilok et al., 2005).

La région 5'NC est une bonne cible pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Des études d'inhibition de la traduction par des ARN interférents dirigés contre cette région ont en effet été publiées ces dernières années (Kanda et al., 2007; Prabhu et al., 2006; Ray and Das, 2004). Par ailleurs, Jopling et collaborateurs ont montré qu'un micro-ARN (miR-122), spécifiquement exprimé dans les hépatocytes humains, facilite la réplication de l'ARN viral en interagissant avec la région 5'NC du génome viral (Jopling et al., 2005).

3.1.2. La région 3' non codante

La région 3' non codante (3'NC), de taille variable (environ 250 nucléotides), présente trois régions distinctes : une séquence peu conservée de 40 à 50 nucléotides; une zone poly-uracile/pyrimidine (poly(U/UC)) de longueur variable ; et une séquence très conservée de 98 nucléotides. Celle-ci joue un rôle important dans l'initiation de la synthèse du brin d'ARN négatif au cours de la réplication (Kolykhalov et al., 1996). La stabilité de la structure

de la région 3'NC semble être importante pour la réplication virale (Friebe and Bartenschlager, 2002). D'autre part, cette région pourrait favoriser la traduction du génome viral (Murakami et al., 2001; Song et al., 2006). En effet, il semblerait que la région 3'NC est capable de stimuler l'activité de l'IRES du VHC, augmentant la traduction du génome viral .

3.2. Les protéines virales

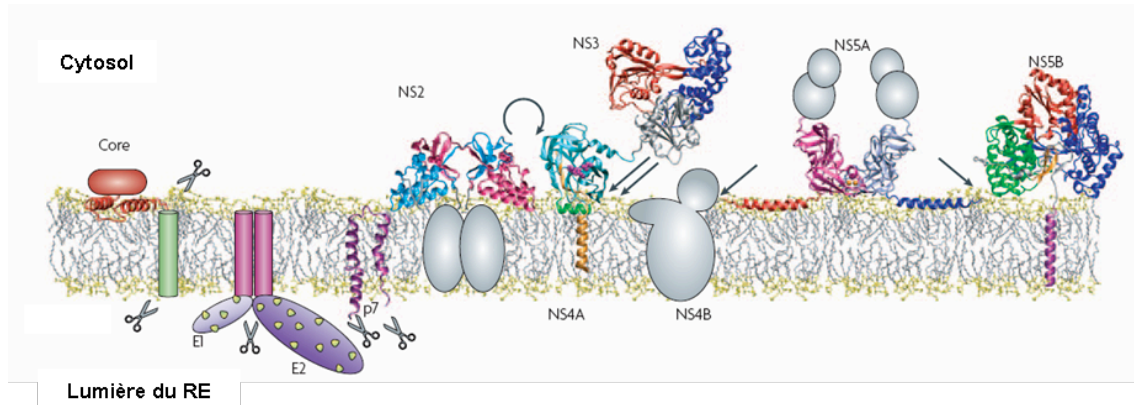


Figure 8. Les protéines du VHC et leur association avec la membrane du RE.
(d'après Moradpour et al. *Nature Reviews Microbiology* 2007)

Le génome du VHC présente un ORF codant une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés, qui est synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et subit différents clivages co- et post-traductionnels (**Figures 7B et 8**). Les clivages C/E1, E1/E2, E2/p7, et p7/NS2 sont assurés par des peptidases signal d'origine cellulaire (Dubuisson et al., 2002). Le reste de la polyprotéine est clivé par deux protéases virales, NS2 et NS3/4A. Ainsi, la traduction de l'ORF aboutit à la formation d'au moins dix protéines matures : C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (**Figures 7B et 8**). Les protéines C, E1 et E2 sont dites « structurales » car elles sont associées aux virions, tandis que les protéines NS (« non-structurales ») joueraient un rôle dans le cycle viral. De plus, il a été décrit qu'un cadre de lecture alternatif chevauchant le début de la séquence de la protéine C code une onzième protéine, la protéine F.

3.2.1. La protéine C

La protéine de capsid ou protéine C est l'élément protéique de la nucléocapsid virale. Elle est très conservée et fortement antigénique (Houghton et al., 1991). Cette protéine peut exister sous différentes formes. D'abord, un clivage à son extrémité C-terminale donne naissance à une forme « immature », de 23kDa et formée des 191 premiers acides aminés de la polyprotéine précurseur (Santolini et al., 1994). Ensuite, l'action d'une peptidase de peptide signal (SPP) conduit à la forme dite « mature » d'environ 21kDa (McLauchlan, 2000; McLauchlan et al., 2002).

Au sein de la protéine de capsid, trois domaines fonctionnels ont été décrits (Hope and McLauchlan, 2000). Le domaine 1 (acides aminés 1 à 118) constitue une région de liaison avec la région 5'NC du génome, permettant la formation de la nucléocapsid. Le domaine 2 (acides aminés 119 à 174) assure la maturation et la mise en conformation du domaine 1 (Boulant et al., 2005), mais il est aussi important pour conférer les propriétés membranaires de la protéine. En effet, la capsid est retrouvée au niveau des membranes, telles que celles du RE (**Figure 8**), mais elle est localisée majoritairement dans un compartiment associé aux GL des cellules infectées (Rouille et al., 2006). Il a été d'ailleurs suggéré que l'interaction avec les GL pourrait affecter le métabolisme des lipides et contribuer au développement de la stéatose hépatique, surtout chez les patients infectés par le VHC de génotype 3 (Asselah et al., 2006). Enfin, le domaine 3 (acides aminés 175 à 191) sert de peptide signal pour le clivage entre C et E1 et pour l'adressage de E1 dans la lumière du RE (Santolini et al., 1994).

La protéine de capsid pourrait intervenir dans la régulation de l'expression de certains gènes cellulaires (Jackel-Cram et al., 2007; Nguyen et al., 2006; Sillanpaa et al., 2008; Watashi and Shimotohno, 2003), dans l'apoptose (pour revue (Fischer et al., 2007)), dans la prolifération cellulaire (Jin et al., 2005; Sato et al., 2006) et pourrait interférer avec le métabolisme lipidique (Jarmay et al., 2005; Jhaveri et al., 2008; Kim et al., 2007). Cependant, certaines de ces fonctions sont encore controversées.

3.2.2. La protéine F

Parallèlement à la traduction de l'ORF, une petite protéine nommée protéine F ou ARFP (protéine issue d'un cadre alternatif de lecture) (Branch et al., 2005; Lo et al., 1995; Lo et al., 1994) est synthétisée. Son gène chevauche en partie celui de la protéine de capsid. Des études dans des systèmes de réticulocytes de lapin indiquent que cette protéine est produite par un décalage du cadre de lecture -2/+1 au niveau d'une séquence de glissement, les codons 8-11 de la séquence codant la protéine de capsid (Varaklioti et al., 2002; Xu et al., 2001). D'autres études réalisées en culture cellulaire indiquent que des sites internes d'initiation de traduction existent dans les positions 26 et 85-87 de la séquence codant la protéine de capsid (Baril and Brakier-Gingras, 2005; Vassilaki et al., 2008; Vassilaki and Mavromara, 2003).

La protéine F possède une taille variable en fonction du génotype étudié, mais ne dépasse pas 160 acides aminés (Boulant et al., 2003). Sa localisation intracellulaire est périmucléaire (Roussel et al., 2003), en association avec le RE (Vassilaki et al., 2008; Xu et al., 2001) et sa demi-vie est estimée à dix minutes, car elle est dégradée par le protéasome (Roussel et al., 2003; Xu et al., 2003). Bien que sa fonction reste inconnue, son expression ne semble pas nécessaire à la réplication de l'ARN viral (McMullan et al., 2007).

Récemment, il a été suggéré que la protéine F jouerait un rôle transformant chez des patients infectés, via sa capacité à stimuler le proto-oncogène de c-myc (Ma et al., 2008). De plus, il a été montré qu'elle pourrait avoir des fonctions immunomodulatrices (Fiorucci et al., 2007). Certains patients présentent d'ailleurs des anticorps et une réponse immunitaire cellulaire anti-F (Bain et al., 2004; Komurian-Pradel et al., 2004; Varaklioti et al., 2002; Walewski et al., 2001; Xu et al., 2001).

3.2.3. Les protéines d'enveloppe E1 et E2

Un chapitre sur les protéines d'enveloppe du VHC est développé par la suite (Cf partie III.1.).

3.2.4. La protéine p7

La protéine p7 est constituée de 63 acides aminés (747 à 809) et se situe à la jonction entre les protéines structurales et non structurales (Lin et al., 1994). La comparaison des séquences de p7 de différents génotypes montre une relative variabilité des acides aminés, cependant l'organisation globale et la nature des résidus demeurent constantes (Carrere-Kremer et al., 2002). La protéine p7 possède deux domaines transmembranaires (TMD), ancrés dans les membranes du RE (**Figure 8**) et les extrémités N- et C-terminales sont dirigées vers la lumière du RE (Carrere-Kremer et al., 2002). Elle est également retrouvée au niveau des membranes mitochondriales (Carrere-Kremer et al., 2002; Griffin et al., 2005).

Des études indiquent que p7 aurait une activité de canal ionique au sein de membranes (Griffin et al., 2004; Pavlovic et al., 2003; Premkumar et al., 2004), qu'elle est essentielle à l'infection du VHC chez les chimpanzés (Sakai et al., 2003) et qu'elle agit à une étape précoce de la morphogenèse des particules infectieuses (Jones et al., 2007). Il a en effet été montré que la protéine p7 est essentielle à l'assemblage et sécrétion efficace de virions infectieux (Steinmann et al., 2007).

3.2.5. La protéine NS2

La protéine NS2 (acides aminés 810 à 1026) est une protéine transmembranaire non essentielle à la formation du complexe de réplication du VHC (Blight et al., 2000; Lohmann et al., 1999). Lorsque NS2 est exprimée seule, elle se retrouve associée aux membranes du RE (**Figure 8**) (Franck et al., 2005). NS2 forme avec le tiers amino-terminal (N-terminal) de NS3 une autoprotéase, qui assure le clivage entre NS2 et NS3 (pour revue (Lindenbach and Rice, 2005)). La structure du domaine catalytique de NS2 montre une protéase à cystéines, de forme dimérique, avec deux sites actifs (Lorenz et al., 2006). Cette protéase nécessite une activation par la protéine chaperon cellulaire Hsp90 (Waxman et al., 2001).

Bien que le rôle de NS2 ne soit pas connu, plusieurs fonctions lui ont été attribuées. Elle serait impliquée dans la phosphorylation de NS5A (Liu et al., 1999) et pourrait participer à la morphogénèse du VHC (Jones et al., 2007; Yi et al., 2007). Par ailleurs, des sites de recombinaison conduisant à la formation de virus infectieux chimériques intergénomiques ont été cartographiés dans NS2 (Legrand-Abravanel et al., 2007; Lindenbach and Rice, 2005; Noppornpanth et al., 2006; Pietschmann et al., 2006).

3.2.6. Les protéines NS3 – NS4A

La protéine NS3 (acides aminés 1027 à 1657) possède une double fonction enzymatique. Sa région N-terminale a une fonction sérine protéinase, alors que son extrémité C-terminale possède une activité hélicase et NTPase. La fonction sérine protéinase du tiers N-terminal de NS3 se rapproche de la famille des sérine protéinases de type chymotrypsine. Ce domaine de NS3 est associé au cofacteur NS4A (acides aminés 1658 à 1711), ce qui permet son stabilisation, car NS3 est dégradée rapidement en absence de NS4A. Cette association entre NS3 et NS4A assure l'activation des clivages entre NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B (Lindenbach et al., 2005). De plus, elle permet l'interaction de NS3 avec la membrane du RE, puisque, contrairement à NS4A, NS3 ne possède pas de TMD (**Figure 8**). Quand NS3 est exprimée seule, elle se diffuse librement à travers la cellule (Wolk et al., 2000). Le domaine hydrophobe N-terminal de NS4A est également nécessaire à l'adressage de NS3 dans le RE.

L'extrémité C-terminale de NS3 code une hélicase à ARN (Tai et al., 1996). Ces enzymes sont capables de dérouler des duplexes ARN-ARN. Il a été montré qu'une forme monomérique de NS3 est capable de lier l'ARN, mais que le déroulement des duplexes d'ARN nécessite un dimère (Serebrov and Pyle, 2004). L'activité hélicase est nécessaire à la réplication de l'ARN, mais l'étape précise n'est pas encore déterminée (Lam and Frick, 2006). Il serait possible que cette fonction soit active lors de l'initiation de la réplication de l'ARN, en déroulant les structures secondaires des brins positifs et négatifs de l'ARN viral. L'hélicase de NS3 pourrait également contribuer à la processivité du complexe de réplication en éliminant les structures secondaires internes et/ou en déplaçant les protéines liées à l'ARN. Il a d'ailleurs été décrit que NS3 peut interagir avec certaines protéines cellulaires (Tellinghuisen and Rice, 2002). Enfin, elle pourrait servir à dissocier la forme répliquative de l'ARN.

Récemment, il a été proposé que NS3 pourrait être impliquée dans la carcinogénèse (Deng et al., 2006). Par ailleurs, il semblerait que la protéase NS3-4A soit impliquée dans l'inhibition de la réponse antivirale innée chez les cellules infectées (Evans and Seeger, 2006; Foy et al., 2003). Pour cela, elle est une bonne cible pour le développement de nouveaux antiviraux (Chen and Tan, 2005; De Francesco and Migliaccio, 2005). En effet,

des peptides mimant la région C-terminale de NS3 sont capables de bloquer la protéase et d'inhiber des réplicons du VHC (Lamarre et al., 2003; Lin et al., 2004b; Malcolm et al., 2006; Steinkuhler et al., 1998). Bien que plusieurs de ces molécules induisent l'apparition de mutations conférant une résistance dans ce système (Lin et al., 2005; Lin et al., 2004a; Yi et al., 2006a), plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours (Huang et al., 2006), notamment avec le telaprevir, comme décrit précédemment. Une autre molécule, la SCH503034, présente également une activité inhibitrice sur le système réplicon (Malcolm et al., 2006), ainsi que chez l'homme, lors d'essais thérapeutiques chez des patients qui n'ont pas répondu au traitement à l'IFN- α (Huang et al., 2006; Sarrazin et al., 2007b).

3.2.7. La protéine NS4B

NS4B (acides aminés de 1712 à 1972) est une protéine hydrophobe, associée aux membranes du RE (**Figure 8**) (Gretton et al., 2005; Lundin et al., 2003). Elle présente quatre TMD et ses deux extrémités N- et C-terminales sont localisées dans le cytosol. Néanmoins, une fraction de l'extrémité N-terminale peut être détectée dans la lumière du RE (Lundin et al., 2003). NS4B induit des modifications membranaires, suggérant qu'une de ses fonctions serait la formation de structures membranaires impliquées dans la réplication de l'ARN viral (Egger et al., 2002). Toutefois, ces structures semblent légèrement différentes du réseau membranaire observé lorsque toutes les protéines virales sont exprimées, indiquant que d'autres protéines seraient également impliquées dans les modifications membranaires (Einav et al., 2004). D'autres études suggèrent l'importance de cette protéine pour la réplication de l'ARN viral. En effet, NS4B possède un motif de liaison aux nucléotides et sa mutation affecte la réplication (Einav et al., 2004). De plus, la palmitoylation de deux cystéines présentes à son extrémité C-terminale semble importante pour la formation du complexe de réplication (Yu et al., 2006). Enfin, des variations de la séquence de NS4B semblent influencer l'efficacité de la réplication virale (Blight, 2007).

3.2.8. La protéine NS5A

NS5A (acides aminés de 1973 à 2420) est une protéine ancrée dans les membranes du RE grâce à son domaine membranaire N-terminal (**Figure 8**) (Brass et al., 2002; Penin et al., 2004). Elle est essentielle à la réplication du VHC (Appel et al., 2006; Seeger, 2005) et interagit avec NS5B, permettant le maintien de la réplication d'un réplicon subgénomique dans des cellules hépatocytaires Huh-7 (Shirota et al., 2002). Cette protéine est également capable de fixer l'ARN du VHC, qu'il s'agisse du brin négatif ou positif (Huang et al., 2005a). Des mutations qui améliorent la réplication de l'ARN viral en culture cellulaire ont été d'ailleurs cartographiées et certaines mutations réduisent la production de particules virales (Appel et al., 2005). NS5A est naturellement phosphorylée et peut également être retrouvée sous forme hyperphosphorylée (Tanji et al., 1995). La relevance de cette forme n'est pas

connue, cependant des mutations qui réduisent son hyperphosphorylation conduisent à une forte augmentation de la réplication génomique du VHC (Appel et al., 2005; Evans et al., 2004).

D'autres études ont montré que NS5A interagit avec différents composants de la voie de signalisation intracellulaire (Reyes, 2002; Tellinghuisen and Rice, 2002) et qu'elle est capable d'inhiber l'induction de l'apoptose en interagissant avec certaines protéines cellulaires (pour revue (Fischer et al., 2007)). Par ailleurs, sa surexpression induit une instabilité chromosomique qui est probablement impliquée dans le développement des hépatocarcinomes liés au VHC (Baek et al., 2006). Enfin, NS5A est impliquée dans la régulation de la réponse à l'IFN (Choi et al., 2006; Machida et al., 2006; Tan and Katze, 2001).

3.2.9. La protéine NS5B

NS5B (acides aminés 2421 à 3011) est une protéine membranaire qui assure la fonction d'ARN polymérase ARN-dépendante, présentant le motif Gly-Asp-Asp (GDD) caractéristique de ces enzymes (Poch et al., 1989). Cette protéine possède un motif d'ancrage membranaire localisé à son extrémité C-terminale (Ivashkina et al., 2002) et elle est retrouvée au niveau des membranes du RE (**Figure 8**) (Schmidt-Mende et al., 2001). Son domaine fonctionnel enzymatique se trouve dans la région N-terminale (Bressanelli et al., 1999) et semble être modulé par des interactions avec d'autres protéines virales, telles que NS3 et NS5A (Bartenschlager et al., 2004).

La protéine NS5B joue un rôle prépondérant au sein du complexe de réplication du VHC. En effet, elle contribue à la synthèse d'ARN de polarité négative à partir du brin positif. L'ARN négatif est ensuite utilisé comme matrice pour la réplication du génome, aboutissant à un ARN de polarité positive. La structure tridimensionnelle de cette protéine révèle une forme de main droite classique avec des « doigts », un « pouce » et une « paume » (Bressanelli et al., 2002; Bressanelli et al., 1999). Le domaine en forme de « paume » contient le site actif enzymatique alors que les « doigts » et le « pouce » forment un tunnel par lequel l'ARN est directement mené au site actif. Les nucléotides nécessaires à l'élongation de l'ARN en cours de synthèse arrivent au niveau du site actif en passant par un autre tunnel chargé positivement.

L'importance de cette protéine pour le cycle viral fait d'elle une cible intéressante pour le développement de nouvelles molécules antivirales (De Francesco and Migliaccio, 2005). Elles peuvent appartenir à deux groupes : les analogues de nucléosides qui s'associent au site actif (Bressanelli et al., 2002; Olsen et al., 2004) et les inhibiteurs allostériques non-nucléosidiques qui se lient à des sites distants du motif GDD (Biswal et al., 2005; Ma et al., 2005; Nguyen et al., 2003; Tomei et al., 2004). Les analogues de nucléosides inhibent

l'élongation de l'ARN, alors que les inhibiteurs allostériques agissent en inhibant l'initiation de la synthèse de l'ARN (Di Marco et al., 2005). Parmi les analogues de nucléosides capables d'inhiber la réplication des réplicons du VHC, le NM283 réduit de manière dose-dépendante la charge virale des patients traités pendant deux semaines. Des essais cliniques en combinaison avec de l'IFN pégylé indiquent une diminution de la charge virale dans une partie significative des patients (De Francesco and Migliaccio, 2005; Huang et al., 2006). D'autres essais cliniques sont en cours avec des inhibiteurs allostériques capables d'inhiber la réplication du VHC en culture cellulaire (Beaulieu and Tsantrizos, 2004; De Francesco and Migliaccio, 2005; Huang et al., 2006). Cependant, plusieurs molécules antivirales ciblant NS5B induisent l'apparition de mutations conférant une résistance dans le système réplicon (Lin et al., 2005; Lin et al., 2004a; Mo et al., 2005; Nguyen et al., 2003; Tomei et al., 2004).

4. Les modèles d'étude

Bien que le clonage du VHC ait permis une analyse rapide de son organisation génomique, ainsi qu'une caractérisation biochimique de ses protéines, l'absence de système de culture cellulaire permettant son amplification efficace a constitué pendant plus de quinze ans un obstacle majeur dans l'étude du cycle infectieux de ce virus. Ces dernières années, trois modèles ont permis des avancées : les réplicons sous-génomiques, les particules rétrovirales pseudotypées avec les protéines d'enveloppe du VHC (VHCpp) et le virus natif infectieux en culture cellulaire (VHCcc). Pendant l'attente de ce dernier, différents modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* ont été utilisés comme modèle de substitution pour l'étude : du cycle viral, des interactions du virus avec l'hôte ou de l'activité antivirale des molécules utilisées contre le VHC.

4.1. Les modèles animaux

Le VHC est un virus qui, dans la nature, infecte uniquement les humains. En effet, jusqu'à présent les scientifiques n'ont jamais détecté d'autre animal infecté par ce virus de manière naturelle. Expérimentalement, le chimpanzé est le seul animal infectable par le VHC de façon reproductible (Alter et al., 1978a; Alter et al., 1978b; Tabor et al., 1978), pouvant développer des infections aiguës ou chroniques similaires à celles observées chez l'homme. Cela a conduit à la détermination des propriétés physicochimiques du VHC (He et al., 1987; Yuasa et al., 1991). Cependant, chez le chimpanzé, la sévérité de la maladie est souvent moins importante que chez l'homme et les réponses immunitaires semblent atténuées (Bassett et al., 1998; Bassett et al., 1999). Dans un premier temps, l'infection expérimentale des chimpanzés a été réalisée par inoculation intraveineuse de plasmas humains contaminés (Bradley et al., 1981; Bradley et al., 1985; Gravelle et al., 1982; Tabor et al., 1978) ou par inoculation intrahépatique des ARN obtenus à partir des ADN complémentaires

(ADNc) (Kolykhalov et al., 1997; Shimizu et al., 1998; Yanagi et al., 1997). Récemment, avec le développement du système cellulaire permettant la production de particules virales, il a été montré que le chimpanzé peut être infecté par ces virions produits en culture cellulaire (Wakita et al., 2005). Ces virions infectieux issus de chimpanzés infectés ont préférentiellement une densité d'environ 1,09 g/mL (Lindenbach et al., 2006). Le problème de l'utilisation de ce modèle pour l'étude du VHC est que le chimpanzé est un animal rare, protégé et son entretien est coûteux. De plus, l'Union Européenne interdit son utilisation à des fins expérimentales.

Des tentatives d'infection d'autres primates, comme le marmouset (Feinstone et al., 1981), le tamarin (Karayiannis et al., 1983) et un mammifère proche des primates, le tupaïa (Xie et al., 1998), ont abouti à une virémie intermittente ou transitoire, sans développement d'une maladie associée. Néanmoins, une étude a montré que l'infection d'hépatocytes primaires de tupaïa par des plasmas humains contaminés par le VHC entraîne une virémie et une faible production de particules virales infectieuses *in vitro* (Zhao et al., 2002).

Les modèles animaux incluent également l'utilisation de souris. Le rôle des protéines du VHC dans la pathogenèse de la maladie a été analysé chez des souris transgéniques exprimant ces protéines (Lerat et al., 2002). Cependant, ces animaux ne sont pas naturellement susceptibles à l'infection et des souris humanisées ont été développées. Ces animaux présentent une immunodéficiência sévère combinée (souris SCID) et sont porteurs d'un transgène activateur de plasminogène (Alb-uPA), ce qui conduit à une destruction de leur foie, recolonisé par des cellules de foie humain. L'infection de ces souris par des sérums humains contaminés par le VHC a permis d'établir une infection persistante et la production de particules virales infectieuses (Mercer et al., 2001). D'autres travaux, consistant à greffer du foie humain contaminé chez des souris immunodéficientes, nommées « VHC-trimera », ont permis de retrouver, de manière transitoire, des particules virales dans le sang des souris et d'évaluer l'effet de molécules antivirales anti-VHC sur leur charge virale (Ilan et al., 2002). Cependant, ces modèles de souris sont très lourds à mettre en place et les animaux nécessitent une intervention chirurgicale très délicate.

4.2. Les modèles cellulaires

4.2.1. Les cellules infectées par du VHC isolé de sérums de patients

Les hépatocytes sont considérés comme la cible naturelle du VHC *in vivo*. Pour cela, des hépatocytes primaires humains ou de chimpanzés ont été utilisés pour essayer d'établir un système d'infection efficace du VHC. Ces cellules ont été infectées par des sérums de patients atteints d'hépatite C chronique (Castet et al., 2002; Fournier et al., 1998; Iacovacci et al., 1997; Lanford et al., 1994; Molina et al., 2007; Molina et al., 2008; Rumin et al., 1999).

Une étude a également porté sur la mise en culture de cellules provenant du foie de patients chroniquement infectés par le VHC (Ito et al., 1996). Néanmoins, dans tous ces essais, la réplication et la propagation virales étaient faibles. De plus, ces systèmes sont peu reproductibles et il est extrêmement difficile de se procurer des foies humains en bonne santé. Par ailleurs, la permissivité des hépatocytes primaires au virus est transitoire et varie en fonction du donneur, car il dépend du titre viral et de la capacité du virus à se complexer à des Ig ou à des lipoprotéines présentes dans le sérum. Ces paramètres expérimentaux étant peu contrôlables, cette méthode d'étude est difficilement standardisable.

D'autres essais ont été réalisés en infectant des cellules mononuclées du sang avec des sérums de patients infectés (Cribier et al., 1995). Ces essais ont confirmé que le VHC se réplique dans ces cellules, mais les taux de production virale étaient trop faibles pour que ce modèle serve à l'étude du cycle viral. Une autre méthode était l'utilisation de lignées cellulaires stables. La plupart de ces essais consistaient en l'utilisation de surnageant de culture d'une lignée transfectée par des ARN du VHC, pour infecter des cellules naïves de cette même lignée. Malgré la réplication de l'ARN viral dans ces systèmes, la production de particules virales restait cependant très faible (Aizaki et al., 2003; Ikeda et al., 1998). Une de ces études a réussi à montrer que même les lignées lymphocytaires T (MOLT-4 et MT-2) et B (Daudi) seraient permissives à la réplication du VHC (Shimizu et al., 1992).

4.2.2. Les systèmes d'expression hétérologue des protéines structurales

De nombreux systèmes d'expression des protéines du VHC ont été utilisés dans le but de mieux comprendre leurs fonctions. Ils reposaient sur la transfection de lignées cellulaires par des constructions plasmidiques, l'infection ou la transduction de cellules par un virus recombinant. Ces derniers ont l'avantage de permettre la production d'une grande quantité de protéines de qualité satisfaisante. Dans ce sens, les propriétés vectorielles des virus de la vaccine ou du virus Sindbis ont été utilisées pour synthétiser les protéines structurales du VHC en cellules hépatocytaires HepG2 (Dubuisson et al., 1994). De même, ces protéines ont été exprimées en cellules de mammifère en utilisant un vecteur adénovirus (Seong et al., 1998).

Un outil clé pour l'identification de molécules réceptrices du VHC a été les formes solubles de la glycoprotéine E2 (**Figure 9A**). La région TMD de ces protéines a été délétée (Michalak et al., 1997), car elle contient des signaux de rétention à la membrane du RE et d'hétérodimérisation (**Figure 12**) (Cocquerel et al., 2000; Dubuisson et al., 2000; Op De Beeck et al., 2000), des propriétés qui rendaient leur purification difficile.

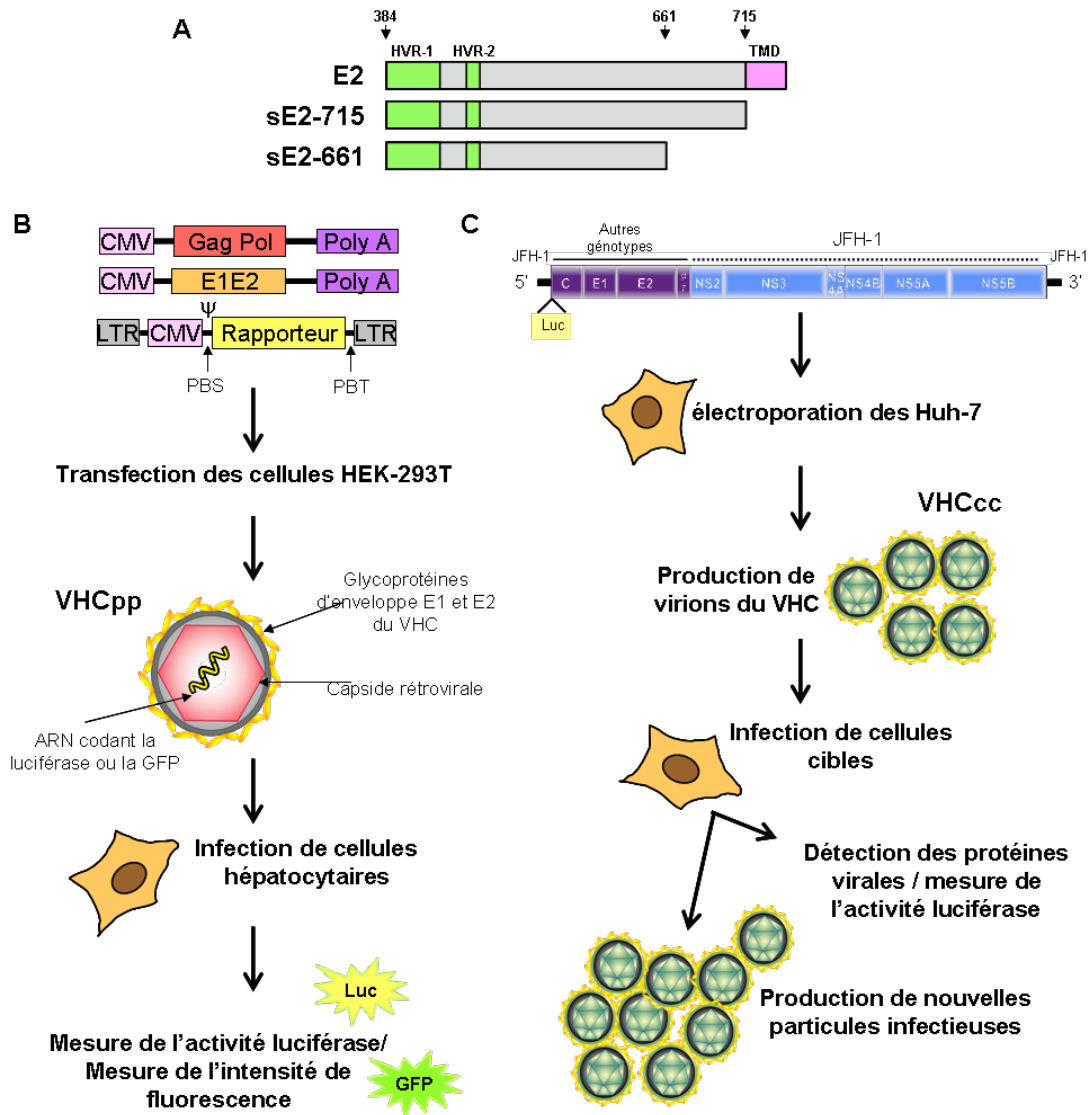


Figure 9. Modèles d'étude de l'entrée du VHC dans les cellules cibles *in vitro*.

A) Les deux formes solubles de l'ectodomaine de la glycoprotéine d'enveloppe E2 (sE2) tronquées au niveau des acides aminés 715 et 611 sont représentées schématiquement. **B)** Le système de production de pseudoparticules rétrovirales du VHC (VHCpp) repose sur la co-transfection des HEK-293T avec un vecteur d'expression qui code les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC sous contrôle du promoteur du cytomégalo virus (CMV); un vecteur exprimant les protéines codées par les gènes *gag* et *pol* d'un rétrovirus, MLV ou VIH; et un troisième qui contient des séquences rétrovirales nécessaires à la transcription reverse, à l'encapsidation et à l'intégration du gène rapporteur luciférase ou GFP dans l'ADN génomique de la cellule infectée (LTR, pour *long terminal repeat*; PBS, pour *primer binding site*; PPT, pour *polyurine track*). L'infection des cellules cibles est détectée par la mesure de l'activité luciférase ou de l'intensité de fluorescence. **C)** Les particules du VHC en culture cellulaire (VHCcc) sont produites par transfection du génome JFH-1 (génotype 2a) dans des cellules hépatiques Huh-7. La séquence codant les protéines structurales peut être remplacée par celle d'autres génotypes. Un gène rapporteur luciférase est parfois intégré dans la portion N-terminale de la protéine de capsid (C) permettant de quantifier l'infection virale.

Deux formes solubles de E2 (sE2) sont généralement utilisées : une forme tronquée en position 715 (sE2-715) juste en amont du TMD et l'autre en position 661 (sE2-661) (Figure 9A). La forme sE2-661 est la mieux exprimée et présente certaines caractéristiques

fonctionnelles de la protéine native (Flint et al., 2000; Michalak et al., 1997). Elle a servi à l'identification de protéines cellulaires de surface impliquées dans l'entrée du VHC, telles que CD81 (Pileri et al., 1998), le récepteur scavenger classe B de type I (SR-BI) (Scarselli et al., 2002) et l'héparane sulfate (Barth et al., 2003). Bien que sE2 ait constitué un outil très utile pour étudier l'attachement du VHC, elle ne présente pas une conformation fidèle de E2 associée à la particule virale (Brazzoli et al., 2005; Cocquerel et al., 2003b; Drummer et al., 2006; Owsianka et al., 2001; Zhang et al., 2004a). Les glycoprotéines E1 et E2 ont tendance à mal se replier et à former des agrégats lorsqu'elles ne sont pas associées à la membrane. De plus, Flint et collaborateurs ont montré que la forme sE2-661 ne reflète pas les hétérodimères présents à la surface des VHCpp et VHCcc impliqués dans l'attachement à CD81 (Flint et al., 2006).

4.2.3. Les pseudo-virions et virosomes

Une autre méthode consistait à utiliser des baculovirus recombinants, exprimant l'ensemble des protéines structurales du VHC, pour produire, en cellules d'insecte, du matériel particulaire ressemblant à des particules du VHC (VLP) (Baumert et al., 1998; Choi et al., 2004). Plusieurs études ont analysé l'interaction de ces VLP avec les cellules cibles (Chapel et al., 2006; Fipaldini et al., 1999; Jeong et al., 2004; Martyn et al., 2007; Matsuo et al., 2006; McCormick et al., 2002; Saunier et al., 2003). Cependant, il est important de noter que les cellules d'insecte possèdent une voie de glycosylation différente de celle des cellules de mammifères, et que la glycosylation de E1 et E2 est très importante non seulement pour le repliement correct de ces protéines, mais également pour l'entrée virale (Goffard et al., 2005). D'autres études ont rapporté l'obtention de virus pseudotypés du virus de la stomatite vésiculaire exprimant des glycoprotéines recombinantes E1 et E2 du VHC (Buonocore et al., 2002; Lagging et al., 1998; Matsuura et al., 2001). Cependant, ces protéines E1 et E2 recombinantes ne possédaient pas leur TMD et il a été montré qu'ils sont importants pour l'hétérodimérisation de E1E2 et pour l'entrée virale (Ciczora et al., 2005; Cocquerel et al., 1998). Une approche alternative pour analyser les phases précoces de l'entrée virale était l'incorporation des protéines d'enveloppe E1 et E2 dans des vésicules lipidiques de type liposomes (Lambot et al., 2002). Néanmoins, ces virosomes sont difficiles à préparer, ils ne sont pas infectieux et les protéines d'enveloppe présentes à leur surface ne suivent pas la voie de sécrétion classique, n'étant donc pas correctement maturées.

Enfin, un système utilisant des réplicons du virus de la forêt de Semliki exprimant les protéines de structure du VHC a été utilisé pour étudier les étapes initiales du bourgeonnement (Blanchard et al., 2002). Par la suite, il a permis d'étudier le rôle de la capsid dans la formation des particules virales et de visualiser la formation des particules

dans le RE (Roingard et al., 2004). Néanmoins, ce système ne permet pas non plus la production de particules infectieuses.

4.2.4. Les particules rétrovirales pseudotypées avec E1 et E2 du VHC

Les particules rétrovirales pseudotypées avec les glycoprotéines d'enveloppe du VHC (VHCpp) sont des virus chimériques recombinants constitués du corps viral du virus de la leucémie murine (MLV) ou du VIH, des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC et d'un gène rapporteur codant la protéine verte fluorescente (GFP) ou la luciférase (Bartosch et al., 2003c; Drummer et al., 2003; Hsu et al., 2003). Ces particules s'auto-assemblent dans les cellules embryonnaires humaines HEK-293T après transfection de trois vecteurs d'expression : le premier exprime les glycoprotéines E1 et E2 natives, le deuxième exprime les protéines codées par les gènes *gag* et *pol* du MLV ou du VIH (matrice, capsid, protéase, reverse-transcriptase et intégrase) et le troisième exprime le gène rapporteur, qui sera le seul à être encapsidé dans la nucléocapside rétrovirale et intégré dans le génome cellulaire (**Figure 9B**). Les protéines d'enveloppe des rétrovirus peuvent également être substituées par les protéines d'enveloppe d'autres virus.

Les VHCpp sont sécrétées dans le milieu de culture cellulaire et permettent une bonne transduction de cellules, de manière dépendante de la présence de E1 et E2 à leur surface (**Figure 9B**). Elles présentent un tropisme préférentiel pour les cellules d'origine hépatique (Bartosch et al., 2003c). De plus, elles sont neutralisées spécifiquement par des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine E2 et par des sérums de patients infectés (Bartosch et al., 2003a; Bartosch et al., 2003c; Op De Beeck et al., 2004). Par contre, les pseudo-particules ne sont pas capables de se répliquer, permettant uniquement l'étude de l'étape d'entrée du VHC dans ses cellules cibles.

4.2.5. Les réplicons

Du fait de l'absence de systèmes cellulaires permissifs, l'étude de la réplication du VHC a été limitée jusqu'au développement des réplicons du VHC (Lohmann et al., 1999). Les réplicons sont des ARN réplicatifs autonomes contenant typiquement une séquence codant un marqueur de sélection, comme par exemple la néomycine, sous le contrôle de l'IRES du VHC. Le gène de résistance à l'antibiotique est fusionné à la séquence N-terminale de la protéine de capsid. Ensuite, l'IRES hétérologue du virus de l'encéphalomyocardite est responsable de la traduction du cadre de lecture du VHC, le tout étant encadré par les régions 5'NC et 3'NC du VHC (pour revue (Bartenschlager, 2006; Bartenschlager and Lohmann, 2001). Des ARN bicistroniques compétents pour la réplication et codant la polyprotéine entière ont également été décrits (Ikeda et al., 2002; Pietschmann et al., 2002). Ces ARN génomiques, qui possèdent l'intégralité du génome viral, et les ARN sous-génomiques se répliquent de manière efficace dans les cellules hépatocytaires Huh-7

sous pression de sélection. Il a été montré que l'insertion de la séquence codant les protéines non structurales de NS3 à NS5B est nécessaire à la réplication (Ikeda et al., 2002; Lohmann et al., 1999). De plus, des mutations d'adaptation à la culture cellulaire augmentent significativement les niveaux de réplication des nouvelles cellules transfectées (Blight et al., 2000; Krieger et al., 2001; Lohmann et al., 2001; Lohmann et al., 1999). Un certain nombre de ces mutations ont été identifiées dans NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (Blight et al., 2000; Evans et al., 2004; Ikeda et al., 2002; Lemon, 2007; Neddermann et al., 2004). D'autre part, la réplication de ces ARN est fortement influencée par le status de prolifération des cellules hôtes, Huh-7, avec une diminution des ARN viraux lorsque les cellules atteignent une forte densité (Pietschmann et al., 2002; Scholle et al., 2004). Inversement, la synthèse de l'ARN est fortement stimulée pendant la phase S du cycle cellulaire (Scholle et al., 2004). Les cellules avec des réplicons peuvent être « guéries » de la réplication de l'ARN du VHC par un traitement avec des concentrations modérées d'IFN- α (Blight et al., 2002; Scholle et al., 2004). Cela a permis la sélection de cellules hautement permissives pour la réplication de l'ARN viral lorsqu'elles sont re-transfectées avec les ARN réplicons, les cellules Huh-7.5 (Lemon, 2007).

L'utilisation des réplicons a permis des avancées importantes dans l'étude de la réplication virale. Ces systèmes permettent l'étude de l'efficacité et des mécanismes d'action de molécules antivirales ciblant cette étape du cycle viral. Bien qu'aucun de ces réplicons n'ait permis la sécrétion de virions infectieux (Blight et al., 2003; Ikeda et al., 2002; Pietschmann et al., 2002; Sun et al., 2004), les études des clones moléculaires fonctionnels ont permis, par la suite, l'établissement du système de production virale en culture cellulaire.

4.2.6. Les particules du VHC produites en culture cellulaire

Le moyen le plus efficace et le plus pratique pour étudier un virus est de pouvoir le multiplier et le produire en culture cellulaire. En 2001, un réplicon subgénomique de génotype 2a (souche JFH-1) a été cloné à partir d'un génome du VHC issu d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulminante (Kato et al., 2003). L'équipe japonaise a transcrit, à partir de l'ADNc du génome de ce clone JFH-1, l'ARN viral de longueur totale. La transfection de cellules hépatocytaires Huh-7 avec cet ARN a conduit à la production de particules infectieuses (**Figure 9C**) (Wakita et al., 2005). Ces particules virales ont été appelées VHCcc, pour VHC produit en culture cellulaire. Les VHCcc sont infectieuses sur des hépatocytes primaires humains, sur des cellules Huh-7 naïves, chez le chimpanzé et chez des souris transplantées avec des hépatocytes humains (Lindenbach et al., 2005; Molina et al., 2008; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). De plus, le sérum de chimpanzé infecté par les VHCcc permet la réinfection de cellules Huh-7 naïves (Wakita et al., 2005). La taille des particules intracellulaires est similaire à celle des particules sécrétées, mais la

densité semble différente (Gastaminza et al., 2006). L'analyse biochimique des particules sécrétées révèle une densité variant entre 1,15 et 1,17g/mL. Elles sont sphériques et mesurent environ 55nm de diamètre (Wakita et al., 2005).

Des systèmes de culture cellulaire permettant de produire des particules infectieuses d'autres génotypes ont été décrits depuis, mais l'efficacité de ces systèmes de production est plus faible (Kato et al., 2007; Yi et al., 2006b). Plusieurs études ont alors porté sur la construction de virus chimériques. Des analyses sur un virus chimérique intragénotypique constitué du génome codant les protéines C-NS2 de la souche J6 (génotype 2a) fusionné au génome codant les protéines NS3-NS5B de la souche JFH-1 (génotype 2a) (Koutsoudakis et al., 2006; Lindenbach et al., 2005) ont permis de montrer que ces chimères se répliquent et sécrètent du virus infectieux (Koutsoudakis et al., 2006; Lindenbach et al., 2005). Ces virus chimériques sont également infectieux chez le chimpanzé et les souris humanisées, et les virus issus des animaux sont également capables d'infecter les cellules Huh-7 (Lindenbach et al., 2006). Cette dernière étude indique que le virus récupéré des animaux est plus infectieux, mais il se modifie rapidement après un passage en culture cellulaire. En outre, il y a une différence dans la répartition de la densité des particules virales selon leur provenance ; les virus plus infectieux présentent une densité plus faible (Lindenbach et al., 2006). La confluence des cellules au moment de l'infection semble être également importante pour la cinétique et l'efficacité de sécrétion de nouveaux virions (Koutsoudakis et al., 2006). Cependant, l'inconvénient des systèmes JFH-1 et J6/JFH-1 est que les particules sécrétées sont issues d'un génotype 2a pour lequel on ne dispose pas suffisamment d'outils. Des chimères intergénotypiques ont alors été produites avec la partie N-terminale du génome codant la polyprotéine jusqu'à NS2 des génotypes 1b (Con1), 1a (H77), 3a (452), 4a (ED43) fusionnés à la partie NS3-NS5B du génotype 2a du JFH-1 (Koutsoudakis et al., 2006; Pietschmann et al., 2006; Yi et al., 2007) (Scheel 2008). Afin d'améliorer la sensibilité de détection des cellules infectées, des virus chimériques exprimant un gène rapporteur, la luciférase, ont également été produits. Certains auteurs ont construit un génome viral bicistronique composé d'une part du gène rapporteur et d'autre part du génome du VHC (Koutsoudakis et al., 2006). D'autres, ont produit un génome viral monocistronique dans lequel le gène de la luciférase a été fusionné à la partie 5' du gène de la capsid (Tscherne et al., 2006). Les deux systèmes ont montré que l'apport de la luciférase permet d'améliorer la quantification des cellules infectées.

D'autre part, plusieurs équipes ont cherché à augmenter le titre infectieux puisque l'équipe de Wakita et collaborateurs obtenait une production assez faible, de l'ordre de 10^3 unités formant des foyers par millilitre (ffu/ml) (Wakita et al., 2005). Dans un premier temps, Cai et collaborateurs ont obtenu une bonne production de particules virales infectieuses en utilisant des cellules Huh-7 transformées stablement par l'ADN du JFH-1 (Cai et al., 2005b).

Dans un deuxième temps, les études ont porté soit sur l'utilisation de cellules hautement permissives à la réplication virale, soit sur l'utilisation de chimères, ou encore en combinant les deux facteurs. Une population clonale de cellules issues de la lignée Huh-7.5 (nommée Huh-7.5.1) produit en effet un bon titre viral, de l'ordre de 10^4 - 10^5 ffu/ml (Zhong et al., 2005). D'autres auteurs ont utilisé la lignée Huh-7.5 et des virus chimériques pour obtenir une production de VHCcc plus élevée (Lindenbach et al., 2005), de l'ordre de 10^5 ffu/ml. Enfin, Delgrange et collaborateurs ont sélectionné un mutant naturel de la protéine E2 présentant une mutation qui change une asparagine en position 534 en lysine. Cette mutation abolit la glycosylation du sixième site de N-glycosylation de la glycoprotéine E2 (N6) et facilite la production virale (10^3 - 10^4 ffu/ml) (Delgrange et al., 2007), suggérant que l'absence de ce glycane favorise l'interaction de E2 avec un récepteur du VHC ou alors cette mutation améliore l'assemblage et la sécrétion des particules infectieuses. Dans cette étude, ils ont montré également que des mutations dans la séquence de la capsid (la mutation de la phénylalanine 172 en cystéine et de la proline 173 en sérine) produisent des virus très infectieux (10^4 - 10^6 ffu/ml) (Delgrange et al., 2007). Enfin, la combinaison des mutations de la capsid avec l'abolition du sixième site de N-glycosylation de E2 produit un virus VHCcc (JFH-1/CS-N6) encore plus infectieux que les précédents, de l'ordre de 10^5 - 10^6 ffu/ml (Delgrange et al., 2007).

Il a fallu presque vingt ans depuis la découverte du VHC pour mettre au point un système de culture cellulaire permettant l'étude *in vitro* de toutes les étapes du cycle répliatif. Jusqu'à présent, cette technique a permis de valider des résultats précédemment obtenus avec d'autres systèmes, comme le rôle de E1 et E2 pour l'entrée virale (Wakita et al., 2005), le tropisme préférentiel pour les cellules hépatiques (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005) et le rôle de récepteurs potentiels impliqués dans l'entrée du VHC (Evans et al., 2007; Grove et al., 2007; Koutsoudakis et al., 2006; Lindenbach et al., 2005; von Hahn et al., 2006; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Cet outil permet également le screening de nouveaux agents antiviraux spécifiques du VHC (Lindenbach et al., 2005) ou de molécules inhibant l'entrée virale (Helle et al., 2006; Lavie et al., 2006). Ce système devrait permettre de progresser encore plus dans la connaissance du cycle de ce virus.

5. Le cycle viral

L'étude du cycle viral du VHC a longtemps été freiné par l'absence de système cellulaire capable de produire des virions infectieux. Cependant, un schéma général des différentes étapes (**Figure 10**) a pu être établi par analogie avec des virus phylogénétiquement proches, mais également grâce à l'utilisation des différents modèles décrits précédemment.

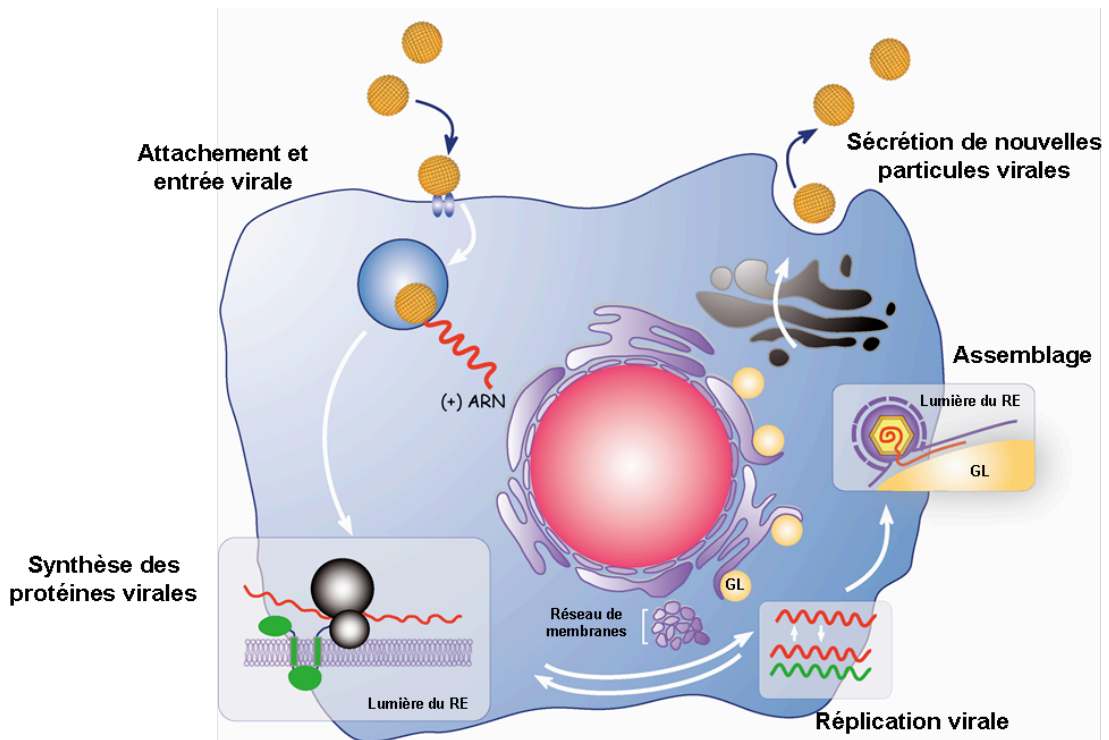


Figure 10. Cycle viral putatif du VHC.

Le virus se lie à la surface des cellules sur ses récepteurs spécifiques, il est ensuite endocyté par une voie dépendante de la clathrine. L'enveloppe virale fusionne alors avec la membrane des endosomes précoces, permettant l'introduction de l'ARN viral dans le cytoplasme. Le génome sert à la synthèse des protéines virales dans le RE et, en parallèle, il sert à la synthèse de brins négatifs qui serviront de matrice pour la synthèse de nouvelles molécules d'ARN de polarité positive. Les protéines structurales servent à l'assemblage de nouvelles particules virales. L'assemblage et l'encapsidation du génome viral sont associés à des gouttelettes lipidiques (GL) cellulaires. Les virions suivent enfin la voie de sécrétion jusqu'à leur export hors de la cellule.

5.1. L'entrée du VHC dans ses cellules cibles

L'interaction sélective des virus animaux avec leur(s) récepteur(s) spécifique(s) présent(s) à la surface des cellules cibles est une étape essentielle à l'initiation de l'infection. Cette interaction détermine souvent le spectre d'hôtes, le tropisme cellulaire et tissulaire du virus et joue un rôle essentiel dans la pathogénicité virale. Une particule virale peut utiliser de façon séquentielle plusieurs molécules durant le processus d'attachement et d'entrée virale. De plus, différents membres d'une même population virale peuvent utiliser des molécules distinctes pour entrer dans la cellule (Schneider-Schaulies, 2000). Le VHC semble utiliser plusieurs récepteurs pour entrer dans la cellule (**Figure 11**). En effet, il a été décrit que la tetraspanine CD81, le récepteur scavenger SR-BI, la claudine 1 et le glycosaminoglycane de type héparane sulfate pouvaient jouer un rôle dans l'entrée du VHC dans ses cellules cibles. Un autre candidat récepteur est le récepteur aux LDL, du fait de l'association des particules virales du VHC avec les lipoprotéines dans le sérum de patients infectés.

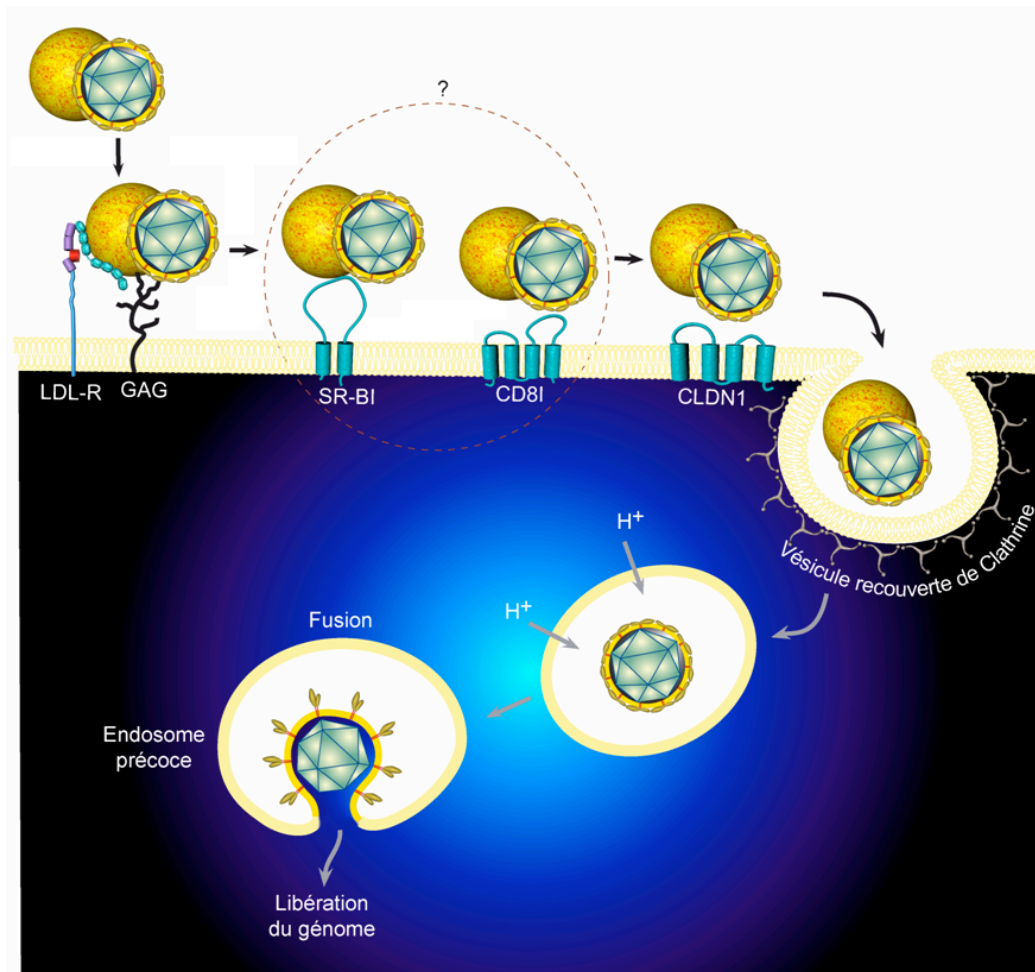


Figure 11. Représentation schématique de l'entrée du VHC dans ses cellules cibles.

Les GAGs et le LDL-R pourraient faciliter l'attachement initial des particules virales sur les cellules, par une interaction directe avec les glycoprotéines d'enveloppe E1E2 ou par l'intermédiaire des lipoprotéines, pour les diriger vers les protéines SR-BI et CD81. CLDN1 agit à une étape tardive du processus d'entrée, après l'attachement et l'interaction avec CD81. Le VHC entre alors dans les cellules par endocytose dépendante de la clathrine jusqu'aux endosomes précoces où la fusion des membranes se produit et le génome est libéré dans le cytoplasme.

Une fois le virus fixé à la cellule, il fusionne son enveloppe avec les membranes cellulaires permettant ainsi la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire et la poursuite du cycle viral. Certains virus enveloppés fusionnent à la membrane plasmique et d'autres suivent une voie d'endocytose. Pour le VHC, il a été montré qu'il est internalisé par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine, qui conduit les particules virales vers les compartiments endosomaux.

Les facteurs jouant un rôle dans l'entrée du VHC dans ses cellules cibles seront plus développés par la suite (Cf partie III.2.).

5.2. La synthèse des protéines et la réplication virale

La synthèse des protéines virales commence par la traduction de l'ORF, aboutissant à la formation des protéines virales (**Figures Figure 7B et Figure 10**). L'entrée du ribosome sur la séquence de l'ARN messenger se fait en amont du codon initiateur de la traduction et est relayée par l'IRES, qui occupe la majeure partie de la région 5'NC (Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Après la traduction, le découpage des protéines virales codées par l'ORF est assuré par des protéases cellulaires et virales. D'abord, une signal peptidase située dans la lumière du RE clive les protéines structurales C/E1, E1/E2, E2/p7 et p7/NS2. Leurs extrémités C-terminales hydrophobes jouent un rôle important dans ce processus, car elles permettent la translocation des protéines dans le RE, leur insertion dans la membrane de ce compartiment et leur clivage. Les protéines non structurales, également ancrées dans la membrane du RE, sont clivées par deux protéases virales (Grakoui et al., 1993) : la protéase NS2 associée à la partie N-terminale de NS3, qui clive la jonction NS2/NS3, et la sérine protéase NS3 associée à son cofacteur NS4A, qui assure le clivage de l'ensemble des jonctions situées en aval (NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B) (Grakoui et al., 1993). Le complexe de réplication se forme pendant la maturation de la polyprotéine précurseur et il contient l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (NS5B), les autres protéines non structurales (NS3 à 5A), des protéines cellulaires et l'ARN viral (Ishido et al., 1998). La protéine NS2 ne semble pas être nécessaire à ce complexe, puisque des réplicons dépourvus de NS2 sont fonctionnels. Le complexe de réplication est associé aux structures membranaires et vésiculaires périnucléaires, qui semblent être le siège de la réplication virale. En effet, une altération spécifique des membranes, appelée réseau membranaire, a été identifiée comme étant le siège de réplication dans les cellules hépatocytaires Huh-7 contenant un réplicon subgénomique du VHC (Gosert et al., 2003). Ce réseau membranaire peut être induit par NS4B seule et ressemble aux « inclusions de type éponge » observées dans des images de microscopie électronique de foie de chimpanzés infectés par le VHC (Egger et al., 2002). Il est admis que le réseau membranaire dérive des membranes du RE. Une fois le complexe de réplication mis en place dans le réseau membranaire, l'ARN polymérase synthétise un brin d'ARN négatif à partir du génome, qui servira ensuite de matrice pour la synthèse de nombreux brins d'ARN positifs. Ces ARN seront encapsidés et enveloppés pour devenir les génomes des particules virales néoformées ou serviront de nouveaux messagers pour la synthèse de nouvelles protéines virales.

5.3. L'assemblage et la sécrétion virale

Les dernières étapes du cycle viral sont très mal connues. L'assemblage est probablement déclenché par l'interaction entre l'ARN génomique et la protéine de capsid, qui aboutit à la formation de la nucléocapside par des mécanismes non encore élucidés

(**Figure 10**) (Shimoike et al., 1999). En particulier, aucun signal d'encapsidation spécifique n'a été identifié. Par analogie avec les Flavivirus, les nucléocapsides du VHC pourraient s'envelopper par bourgeonnement à l'intérieur du RE, éventuellement sous l'influence d'interactions entre la protéine de capsidite et les glycoprotéines d'enveloppe. Les virions seraient ensuite sécrétés par exocytose.

Récemment, il a été montré que dans le système des VHCcc, la protéine de capsidite est associée aux GL (Boulant et al., 2007; Miyanari et al., 2007; Rouille et al., 2006; Shavinskaya et al., 2007), comme décrit avec d'autres systèmes (Dubuisson et al., 2002; Hope and McLauchlan, 2000; McLauchlan, 2000; McLauchlan et al., 2002). Ces études montrent que la protéine de capsidite recrute les protéines non-structurales, notamment NS5A, et les ARN viraux négatifs et positifs vers les GL (Miyanari et al., 2007). Plus spécifiquement, tandis que la capsidite et les GL colocalisent, une fraction des protéines NS et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 se localisent autour du complexe capsidite-GL (Miyanari et al., 2007; Rouille et al., 2006). La protéine de capsidite est également associée à un compartiment membranaire lui-même associé aux GL (Rouille et al., 2006). De manière importante, il a été montré que l'association des protéines virales, de l'ARN viral et des GL, à proximité de ces compartiments membranaires associés aux GL, est essentiel pour la production de nouvelles particules virales (Miyanari et al., 2007). De plus, il semblerait que l'attachement de la capsidite aux GL se fait après son clivage par la SPP, qui serait déterminant pour la production de particules infectieuses (Targett-Adams et al., 2008). Bien que d'autres protéines non structurales semblent être impliquées dans la production de particules infectieuses, comme p7 et NS2 (Jones et al., 2007; Steinmann et al., 2007), NS5A serait nécessaire pour leur association aux complexes capsidite-GL (Miyanari et al., 2007). Dans ce sens, le domaine III de NS5A, et plus spécifiquement la phosphorylation de la sérine 457 par des kinases cellulaires, semble être important pour l'assemblage de virions infectieux (Appel et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008). De plus, la délétion du domaine III de NS5A empêche sa co-localisation avec la protéine de capsidite et les GL, ainsi que la production de particules infectieuses (Appel et al., 2008).

Il a également été montré que la production virale par les hépatocytes était dépendante de l'assemblage et de la sécrétion des VLDL (Gastaminza et al., 2008; Huang et al., 2007). Spécifiquement, le niveau de l'apolipoprotéine B semble être limitant pour l'assemblage des particules infectieuses et la sécrétion des particules dépend de la protéine de transfert microsomal (MTP) du RE, responsable de l'assemblage des VLDL (Gastaminza et al., 2008). Dans ce sens, il a été montré que les particules virales sont assemblées dans un compartiment intracellulaire sous forme de particules de forte densité ($> 1,15\text{g/mL}$), mais qu'elles acquièrent des éléments qui leur confèrent une faible densité ($< 1,14\text{g/mL}$) durant leur sécrétion (Gastaminza et al., 2006). Des mutations empêchant l'association de la

protéine de capsid aux GL bloquent la production de particules infectieuses de basse densité, alors que les particules non-infectieuses de haute densité semblent suivre une voie différente (Miyanari et al., 2007). Le travail de Gastaminza et collaborateurs indique qu'une partie des particules intracellulaires ou des composants essentiels à leur assemblage sont dégradés de manière dépendante de cystéine protéases cellulaires. Cependant, les particules virales de basse densité échappent à la dégradation et sont sécrétées dans le milieu extracellulaire (Gastaminza et al., 2008). De manière intéressante, les cystéine protéases participent également à la dégradation post-RE des apolipoprotéines B et E (Adeli, 1994; Ye et al., 1993) et, chez les patients infectés, les particules du VHC sont associées à ces apolipoprotéines (Andre et al., 2002; Nielsen et al., 2006). Gastaminza et collaborateurs proposent que les particules précurseurs du VHC sont ciblées vers la dégradation, si leur maturation post-RE (par exemple l'addition de lipides) n'a pas lieu (Gastaminza et al., 2008). L'assemblage de ces particules précurseurs se fait dans le RE de manière dépendante de la MTP et leur maturation post-RE est nécessaire à la sécrétion. Ces études indiquent que l'interaction de la protéine de capsid ou des nucléocapsides néoformées avec le métabolisme des lipides pourrait jouer un rôle dans la maturation des virions et expliquer la présence, dans le sang circulant, de particules virales associées aux lipoprotéines, qui constituent d'ailleurs la majeure partie de la fraction infectieuse.

III. L'entrée du VHC dans ses cellules cibles

1. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les glycoprotéines d'enveloppe du VHC jouent des rôles majeurs à différentes étapes du cycle viral. En effet, elles participent à la formation des particules virales infectieuses (Wakita et al., 2005) et sont essentielles à l'entrée des virus dans les cellules cibles (pour revue (Cocquerel et al., 2006).

Les deux glycoprotéines E1 (acides aminés 192 à 383) et E2 (acides aminés 384 à 746) sont produites après clivage de la polyprotéine précurseur par des peptidases signal (Dubuisson et al., 2002) (**Figures 7B, 8 et 12**). Le clivage au niveau des sites C/E1, E1/E2 et E2/p7/NS2 produit E1 et un précurseur E2-p7-NS2. Celui-ci est très rapidement clivé pour libérer E2, une forme E2-p7 et NS2 (Dubuisson et al., 1994). E1 et E2 sont des protéines membranaires de type I avec un large ectodomaine N-terminal hautement N-glycosylé et un TMD C-terminal constitué d'un seul passage (**Figure 12A**). Lors de la traduction de l'ORF, le domaine 3 de la protéine de capsid est responsable du signal de clivage entre C et E1, ainsi que de la translocation de l'ectodomaine de E1 dans la lumière du RE (Santolini et al., 1994). L'ectodomaine de la protéine E2 est également dirigé vers la lumière du RE par un signal présent dans le TMD de E1 (Cocquerel et al., 1999; Cocquerel et al., 2000). Les TMD des deux glycoprotéines sont ensuite ancrés dans la membrane du RE (**Figure 8**) et les glycoprotéines forment des hétérodimères E1E2 qui sont retenus au niveau de ce compartiment.

Les TMD de E1 et E2 ont été largement caractérisés dans le laboratoire et il a été montré que ceux-ci sont multifonctionnels (**Figure 12A**). En effet, en plus de leur fonction d'ancrage membranaire et d'adressage, ces domaines sont responsables de la rétention stricte des hétérodimères E1E2 dans le RE (Cocquerel et al., 1999; Cocquerel et al., 1998; Cocquerel et al., 2000). Ils sont également impliqués dans l'hétérodimérisation des deux glycoprotéines et jouent un rôle dans l'entrée virale (Ciczora et al., 2005). De plus, il a été montré que la mutation de certains résidus des TMD de E1 et de E2 altère la propriété de fusion de ces glycoprotéines d'enveloppe suggérant qu'ils jouent également un rôle majeur dans le mécanisme de fusion (Ciczora et al., 2007). Enfin, il a été montré que des résidus chargés présents dans les TMD de E1 et de E2 sont importants pour la multifonctionnalité de ces domaines (Cocquerel et al., 2000) et cette multifonctionnalité est liée à une dynamique topologique (Cocquerel et al., 2002).

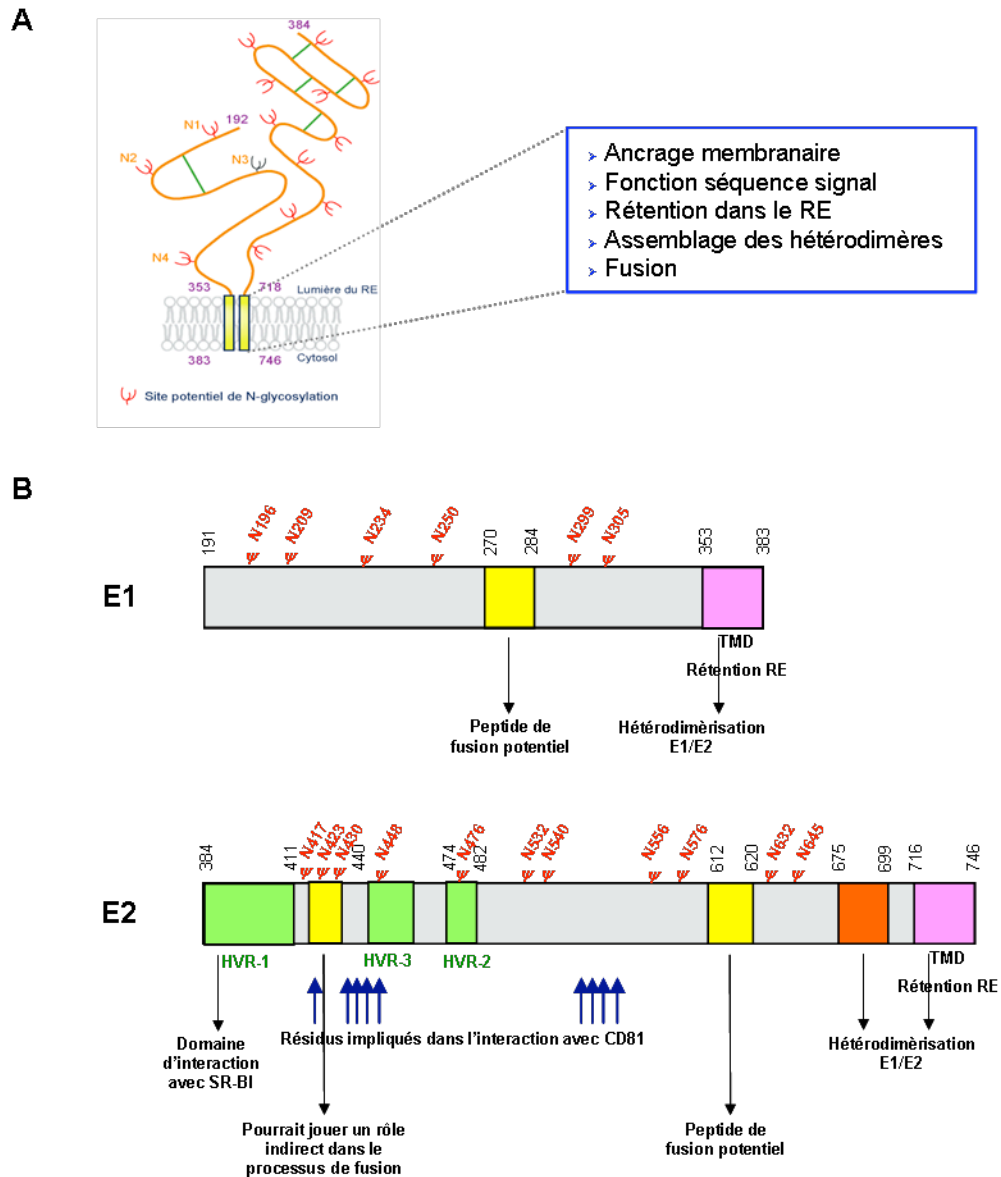


Figure 12. Représentation schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle des glycoprotéines d'enveloppe du VHC.

Des schémas consensuels de l'organisation des domaines structuraux de E1 et E2 sont représentés. Les N-glycanes, en rouge, sont positionnés au dessus; les peptides de fusion prédits sont en jaune; les régions HVR, en vert; et les TMD, en rose. Les résidus de E2 impliqués dans l'interaction avec la molécule CD81 sont indiqués par des flèches bleues: W437, L438, L441, P442 (Drummer *et al.*, *J. Virol.* 2006), W420, Y527, W529, G530, D535 (Owsianka *et al.*, *J. Virol.* 2006).

Au cours de leur passage dans le RE, les glycoprotéines E1 et E2 peuvent former deux types de complexes : les hétérodimères non covalents et les agrégats hétérogènes liés par des ponts disulfures (Deleersnyder *et al.*, 1997; Dubuisson *et al.*, 1994). Il est admis que la forme fonctionnelle soit la première. D'autre part, le repliement de la protéine E1 est dépendant de la co-expression de E2, alors que la protéine E2 peut atteindre un état conformationnel avancé en absence de E1 (Michalak *et al.*, 1997). D'ailleurs, l'interaction entre les TMD des deux protéines est indispensable au repliement de E1 (Dubuisson *et al.*,

2000), mais ne semble influencer que les étapes finales du repliement de E2 (Cocquerel et al., 2002). La mise en conformation de ces deux glycoprotéines est contrôlée par les protéines chaperones du RE, telles que la calnexine, qui s'associe plutôt aux hétérodimères non-covalents, et les protéines calréticuline et BiP, qui interagissent préférentiellement avec les agrégats covalents (Choukhi et al., 1998).

Par ailleurs, E2 contient une région hypervariable d'environ 27 acides aminés (384 à 410), appelée HVR1. La forte variabilité de cette région pourrait permettre aux virus d'échapper au système immunitaire. En effet, des virus délétés de cette région présentent une infection atténuée chez le chimpanzé (Forns et al., 2000). Malgré la variabilité de cette séquence, ses propriétés physico-chimiques et sa conformation spatiale sont relativement conservées à travers les différents génotypes (Penin et al., 2001). Elle est composée de plusieurs acides aminés basiques qui modulent l'infectiosité du VHC (Callens et al., 2005). D'autres régions hypervariables pouvant jouer un rôle dans l'entrée virale ont été décrites : HVR2 (résidus 474 à 482) (Roccasecca et al., 2003; Weiner et al., 1991) et HVR3 (résidus 431 à 466) (Troesch et al., 2006). La région HVR2 est d'ailleurs très conservée parmi les isolats du VHC (McCaffrey et al., 2007).

La glycoprotéine E2 serait plutôt responsable de l'attachement de la particule virale aux cellules cibles en interagissant avec les différentes molécules qui jouent un rôle dans l'entrée virale. Le rôle de E1 dans l'infection est moins bien établi. Cependant, plusieurs anticorps dirigés contre E1 sont capables de neutraliser l'entrée (Dreux et al., 2006; Keck et al., 2004; Pietschmann et al., 2006), ainsi que des anticorps conformationnels reconnaissant les hétérodimères E1E2 (Drummer et al., 2006; Flint et al., 1999a; Hadlock et al., 2000). Il a été montré que les niveaux d'incorporation de E1 seule sur les VHCpp sont réduits et que ces particules ne sont pas infectieuses. Les deux glycoprotéines doivent alors être incorporées sur les particules pour permettre une production virale efficace (Bartosch et al., 2003d; Hsu et al., 2003).

L'utilisation des formes sE2 a permis l'identification de récepteurs putatifs pour le VHC, dont CD81 (Pileri et al., 1998). Cependant, des formes tronquées intracellulaires de E2 s'associent à CD81 avec une plus grande affinité que les formes sécrétées (Flint et al., 2000; Heile et al., 2000), suggérant que des différences structurales existent entre les formes sécrétées et les formes intracellulaires de E2. En effet, certains anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes conformationnels de E2 ne reconnaissent pas la forme sE2-661 ni E2 exprimée en absence de E1. Ceci suggère que des différences de conformation existent entre les hétérodimères E1E2 et les glycoprotéines exprimées seules (Cocquerel et al., 2003b). L'interaction de CD81 avec des hétérodimères E1E2 se fait d'ailleurs avec une plus forte affinité que l'interaction CD81 / sE2 (Cocquerel et al., 2003a). Par ailleurs, la forme sE2 de génotype 1a possède une plus forte affinité pour CD81 que les sE2 d'autres

génotypes. Cependant, les VHCpp-1b infectent les cellules de manière dépendante de CD81, suggérant que l'interaction entre CD81 et sE2 ne prédit pas l'interaction de CD81 avec les VHCpp (Zhang et al., 2004a). En effet, des différences ont été observées en comparant les interactions sE2-CD81 et l'infectiosité de VHCpp et VHCcc (Bertaux and Dragic, 2006; Flint et al., 2006; Zhang et al., 2004a). L'expression de la CD81 de différentes espèces dans les cellules HepG2 permet de les rendre permissives à l'infection des VHCcc et VHCpp, alors que la forme sE2 ne s'associe qu'aux HepG2 exprimant la CD81 humaine, de chimpanzé et de tamarin (Flint et al., 2006). De plus, une mutation dans la séquence de CD81 qui dissociait son interaction avec sE2 permet également de rendre les HepG2 permissives aux VHCpp (Zhang et al., 2004a).

Les ectodomains des protéines E1 et E2 sont hautement glycosylés (**Figure 12B**). La protéine E1 contient quatre sites de glycosylation très conservés (positions 196, 209, 234 et 305). D'autres sites potentiels ne sont conservés que dans certains génotypes : un site en position 250 dans les séquences de génotypes 1b et 6 et un autre site en position 299 dans le génotype 2b (**Figure 12B**) (Goffard and Dubuisson, 2003; Zhang et al., 2004b). La protéine E2 possède neuf sites potentiels de glycosylation très conservés dans tous les génotypes (positions 417, 423, 430, 448, 532, 576, 623 et 645) (**Figure 12B**). Un site en position 476 semble rarement présent dans les séquences de génotype 1b et un autre site, en position 540 est absent des génotypes 3 et de la majorité des génotypes 6. Malgré la forte variabilité du VHC, la conservation importante des sites de glycosylation suggère un rôle essentiel des glycanes dans le cycle viral. Dans le RE, les sites de glycosylation de E1 et E2 sont modifiés par N-glycosylation (Goffard et al., 2005; Goffard and Dubuisson, 2003) et la présence de E2 est indispensable pour que la protéine E1 soit correctement glycosylée (Dubuisson et al., 2000). Toutefois, ce phénomène ne semble pas dépendre d'une séquence spécifique de E2. Par ailleurs, les glycoprotéines associées aux VHCpp contiennent des glycanes complexes, suggérant que certains sont probablement modifiés par des enzymes du Golgi (Op De Beeck et al., 2004) et sont très probablement modifiés après l'assemblage et le relargage des particules virales (Flint et al., 2004; Lozach et al., 2004; Op De Beeck et al., 2004).

L'étude du rôle fonctionnel des glycanes associés aux protéines d'enveloppe du VHC a montré qu'ils jouaient un rôle majeur dans le repliement de ces protéines, ainsi que dans l'entrée virale (Goffard et al., 2005). En effet, certains glycanes sont importants pour le repliement et l'hétérodimérisation de E1 et E2, tandis que d'autres modulent l'infectiosité des VHCpp. Par exemple, les glycanes de E2 en position 417, 532 et 645 réduisent la sensibilité des VHCpp à des anticorps neutralisants et diminuent également l'accessibilité de CD81 à son site d'association sur E2 (Falkowska et al., 2007; Helle et al., 2007). Ceci indique que

ces glycanes sont proches de la région de E2 interagissant avec CD81 et que cette région est une cible majeure des anticorps neutralisants. De plus, la glycosylation de ces trois sites, qui protègent le site d'association à CD81 de la neutralisation, est hautement conservée (Helle et al., 2007). De manière intéressante, une mutation adaptative abolissant le sixième site de N-glycosylation de E2 (en position 532) augmente l'infectiosité des VHCcc (Delgrange et al., 2007).

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont des cibles intéressantes pour le développement de nouveaux anti-viraux. En effet, une lectine issue de cyano-bactéries, la Cyanovirin-N, possède une haute spécificité pour les glycanes présents à la surface virale et inhibe l'entrée du VHC (Helle et al., 2006). De plus, il a été montré pour d'autres virus glycosylés, comme le VIH, que des drogues dirigées contre les glycanes présents sur les protéines d'enveloppe, comme la chloroquine et ses analogues, en combinaison avec le traitement classique, diminue la charge virale (Boelaert et al., 1999; Paton and Aboulhab, 2005; Romanelli et al., 2004; Sperber et al., 1995). Cette approche pourrait être appliquée à d'autres virus glycosylés, car la chloroquine s'accumule dans l'endosome empêchant son acidification, une étape importante pour la fusion et l'entrée dans le cytoplasme cellulaire pour de nombreux virus, comme le VHC. La chloroquine peut également affecter l'activité des glycosyltransférases dans le RE et l'appareil de Golgi, empêchant l'addition de glycanes sur les protéines et l'association avec les protéines chaperon du RE, calnexine et calréticuline. Sans l'assistance de ces protéines chaperones, les protéines virales, comme E1 et E2, ne sont pas correctement repliées et ne sont pas fonctionnelles (Vigerust and Shepherd, 2007).

Des inhibiteurs de glucosidases pourraient également être utilisés contre le VHC. Les glucosidases sont des enzymes de la voie de synthèse des N-glycanes dans le RE et l'utilisation d'inhibiteurs bloque l'infection d'autres membres de la famille *Flaviviridae*, comme le virus de la Diarrhée Bovine et le virus de la Dengue (Durantel et al., 2001; Jordan et al., 2002; Wu et al., 2002; Zitzmann et al., 1999). En ce qui concerne le VHC, en utilisant les systèmes VLP, VHCpp et VHCcc, il a été montré que les inhibiteurs de glucosidase entraînent un mauvais repliement des protéines d'enveloppe et une mauvaise interaction des particules avec les cellules, ce qui diminue l'infectiosité des particules virales (Chapel et al., 2007; Chapel et al., 2006). Bien que ces inhibiteurs ciblent des enzymes cellulaires, la maturation des protéines cellulaires ne semble pas affectée. Le mauvais repliement des protéines virales aurait une conséquence dramatique sur l'assemblage des particules virales, alors que les protéines cellulaires passeraient le contrôle qualité du RE et resteraient biologiquement actives même après quelques changements au niveau de leur glycosylation (Rudd and Dwek, 1997).

2. Les protéines cellulaires impliquées dans l'entrée du VHC

2.1. Les molécules d'attachement

Des formes recombinantes de la protéine E2, des VHCpp et des particules virales présentes dans le sérum de patients infectés interagissent spécifiquement avec les lectines DC-SIGN et L-SIGN (Cormier et al., 2004a; Gardner et al., 2003; Lozach et al., 2004; Lozach et al., 2003; Pohlmann et al., 2003). Ces molécules sont des lectines de type C capables de reconnaître des structures glycanes de manière dépendante du calcium. L-SIGN est exprimée, entre autres, à la surface des cellules de l'endothélium bordant les capillaires sinusoides du foie (Pohlmann et al., 2001). De son côté, DC-SIGN est retrouvée à la surface des cellules dendritiques et de quelques populations de macrophages, comme les cellules de Kupffer, qui se localisent dans le parenchyme hépatique (Soilleux et al., 2002). Ces deux lectines sont capables de reconnaître des structures glycaniques à la surface de certains pathogènes (Koppel et al., 2005). Il a été montré que la liaison de E2 à L-SIGN pouvait induire la transmission de VHCpp à des cellules hépatiques adjacentes (Cormier et al., 2004a; Gardner et al., 2003). Etant donné que L-SIGN et DC-SIGN ne sont pas exprimées à la surface des hépatocytes, elles ne peuvent pas être des récepteurs spécifiques de ces cellules. Dans ce sens, il a été montré qu'elles ne permettent pas l'entrée des VHCpp et VHCcc (Lai et al., 2006). Il est envisageable qu'elles contribueraient à l'établissement de l'infection persistante en capturant et concentrant le virus dans les hépatocytes. Cependant, ce processus doit encore être démontré *in vivo*.

Une autre lectine de type C, le récepteur aux asialoglycoprotéines, a été proposée comme récepteur pour le VHC (Saunier et al., 2003). Elle est localisée principalement à la surface des hépatocytes (Stockert, 1995) et peut interagir avec les VLPs produites dans des cellules d'insectes (Saunier et al., 2003). Néanmoins, ces données n'ont jamais été confirmées dans d'autres systèmes.

Une autre molécule qui semble participer à l'attachement du VHC est le glycosaminoglycane héparane sulfate présent à la surface des hépatocytes (**Figure 11**). Les glycosaminoglycanes (GAG) sont caractérisés par une grande hétérogénéité structurale leur permettant d'interagir spécifiquement avec de nombreuses protéines et ils servent de premier point d'attache cellulaire pour certains virus avant l'interaction avec leur (s) récepteur (s) (Villanueva et al., 2005). D'autres virus, comme le virus de la dengue et celui de la fièvre jaune, s'en servent comme récepteur d'entrée (Chen et al., 1997; Germei et al., 2002b). Par rapport au VHC, il a été montré que la protéine E2 interagit spécifiquement avec l'héparane sulfate présent à la surface des lignées humaines d'origine hépatique (Barth et al., 2003). Par contre, aucune interaction directe avec E2 isolée des VHCpp n'a été démontrée (Callens

et al., 2005). L'héparine (homologue structurale des héparane sulfates), des héparinases et le dextrane sulfate sont capables de diminuer l'attachement de particules virales présentes dans le sérum de patients infectés, de pseudoparticules arborant E1 et E2 chimériques et des VHCcc aux cellules cibles, ainsi que d'inhiber l'infection des VHCcc dans ces cellules (Cribier et al., 1998; Germi et al., 2002a; Koutsoudakis et al., 2006; Meyer et al., 2000). Des expériences de cinétique à 4°C et à 37°C suggèrent que les GAG ne sont pas des récepteurs proprement dits du VHC, mais facilitent plutôt l'attachement des VHCcc à la surface des cellules (Koutsoudakis et al., 2006; Zeisel et al., 2007). Il est possible que le VHC interagisse avec les GAG de façon indirecte, via les lipoprotéines associées aux particules virales. Dans ce sens, la lipoprotéine lipase (LPL) permet une interaction indirecte entre le VHC et les GAG (Andreo et al., 2007). Néanmoins, l'attachement des particules virales via la LPL semble diriger les particules vers une voie non-productive, puisqu'elle inhibe l'infection par les VHCcc.

La participation du récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL-R) dans l'entrée virale a également été proposée (**Figure 11**). En effet, plusieurs observations suggèrent cette participation. D'abord, il a été observé que chez les patients VHC positifs présentant une cryoglobulinémie mixte, les lésions cutanées causées par les complexes de cryoglobulines sont associées à une augmentation du niveau d'expression de LDL-R (Agnello and Abel, 1997). De plus, dans le sérum des patients infectés, les particules infectieuses sont associées à des LDL et des VLDL (Andre et al., 2002), suggérant que le VHC pourrait se servir de sa couverture de lipoprotéines pour utiliser le LDL-R comme récepteur d'entrée dans les cellules cibles. Dans ce sens, des anti-LDL-R, des anti-apolipoprotéines B et E, ainsi que des VLDL et des LDL purifiées inhibent l'entrée du VHC (Agnello et al., 1999; Bartosch et al., 2003c; Chang et al., 2007; Germi et al., 2002a; Monazahian et al., 1999; Wunschmann et al., 2000). Les VLDL pourraient participer à la morphogénèse du virus dans ces cellules, comme expliqué précédemment. De plus, il existe une corrélation entre l'accumulation de l'ARN du VHC dans les hépatocytes primaires, l'expression de l'ARN messager du LDL-R et l'entrée des LDL (Molina et al., 2007). Il a été suggéré que E2 interagirait avec les LDL pour former un complexe qui augmenterait l'affinité du virus pour les LDL-R et faciliterait l'introduction du virus dans la cellule (Nahmias et al., 2006; Wunschmann et al., 2006). Néanmoins, le LDL-R est exprimé également à la surface de cellules non permissives au VHC (Bartosch et al., 2003c), suggérant qu'il n'est pas la seule voie d'entrée des particules.

2.2. Les récepteurs

2.2.1. La tétraspanine CD81

La structure de CD81

CD81 est une protéine appartenant à la famille des tétraspanines. Ces protéines sont composées de quatre TMD, deux boucles extracellulaires, une petite (SEL) et une grande (LEL), et des extrémités N- et C-terminales intracellulaires (**Figures 11 et 13**) (Levy and Shoham, 2005c). La structure de la LEL de CD81 a été analysée par diffraction aux rayons X après cristallisation. Kitadokoro et collaborateurs ont ainsi obtenu un dimère de domaines LEL, chacun constitué de cinq hélices α organisées en deux domaines : les hélices A et E interagissent entre elles pour former un « pied » coiffé des trois autres hélices (B, C et D). Cette « coiffe » est stabilisée par deux ponts disulfures (Kitadokoro et al., 2001). Le « pied » contient une face hydrophobe qui participerait à la dimérisation du domaine LEL en solution, mais pourrait être impliquée dans d'autres types d'interactions dans la molécule entière, notamment avec la SEL (Seigneuret, 2006) (**Figure 13B**). Par ailleurs, les hélices C et D présentent une grande variabilité de séquence entre les différentes tétraspanines humaines, avec seulement 6,7% de résidus conservés (Stipp et al., 2003b). Ce domaine plus variable pourrait donner la spécificité à chaque tétraspanine (Bienstock and Barrett, 2001; Seigneuret et al., 2001).

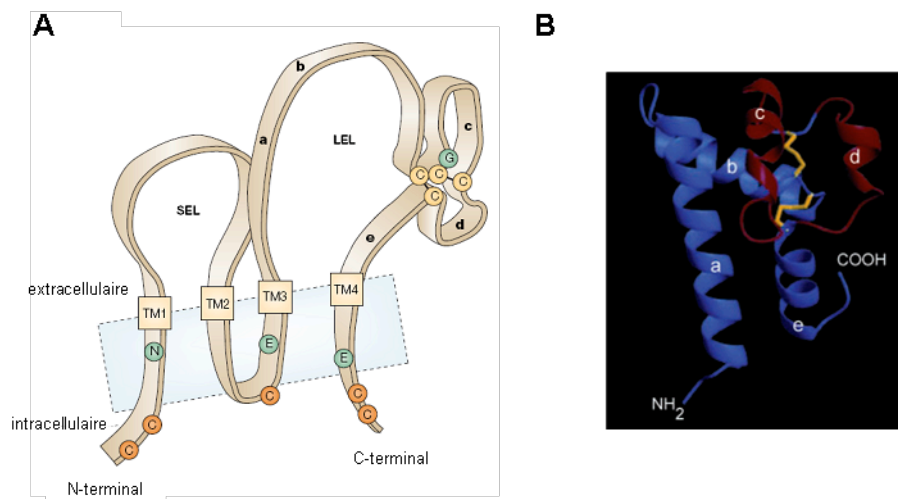


Figure 13. Organisation de la tétraspanine CD81.

A) Représentation schématisée de CD81 (d'après Levy & Shoham, *Nature Reviews Immunology* 2005). Cette molécule possède quatre TMD avec des résidus polaires conservés, deux boucles extracellulaires, une petite (SEL) et une grande (LEL), et des queues cytoplasmiques N- et C-terminales présentant des cystéines juxtamembranaires conservées. La LEL, formée par cinq hélices α , de a à e, contient un motif CCG conservé qui forme deux ponts disulfures avec d'autres cystéines localisées dans la LEL. C = cystéine ; G = glycine ; N= asparagine ; E= acide glutamique. **B)** Structure des hélices α de la LEL. A et E forment un « pied » coiffé par B, C et D. Le domaine variable constitué des hélices C et D est représenté en rouge (d'après Seigneuret *et al.*, *JBC* 2001).

CD81 joue un rôle dans l'entrée du VHC

En 1998, Pileri et collaborateurs ont identifié la tétraspanine CD81 en tant que récepteur du VHC (**Figures 11 et 13**). Cette découverte a été réalisée en utilisant une banque d'ADNc dérivée d'une lignée de lymphocytes T (Molt-4) qui présentait une haute capacité d'interaction avec sE2 du VHC. Ils ont montré que cette interaction pouvait être spécifiquement inhibée par des anticorps dirigés contre CD81. De plus, une forme soluble de la LEL de CD81 humaine pouvait se lier à sE2. L'interaction entre sE2 et la CD81 humaine était inhibée par du sérum de chimpanzés vaccinés avec sE2, démontrant la pertinence physiologique de cette interaction (Pileri et al., 1998). L'interaction de E2 avec CD81 est spécifique de cette tétraspanine car d'autres tétraspanines telles que CD9, CD63 et CD151 ne se lient pas à E2 (Flint et al., 1999a; Zhang et al., 2004a).

Le rôle de CD81 dans l'infection du VHC a été confirmé avec les VHCpp et VHCcc. En effet, l'entrée de ces particules virales est inhibée par des anticorps dirigés contre CD81, ainsi que par une forme soluble de la LEL de CD81 (Bartosch et al., 2003c; Cormier et al., 2004b; Hsu et al., 2003; Lavillette et al., 2005b; Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhang et al., 2004a; Zhong et al., 2005). En outre, l'utilisation d'ARN interférents réduisant l'expression de CD81 dans les cellules hépatocytaires Huh-7 diminue remarquablement l'infection par les VHCpp, VHCcc et particules dérivées de sérums de patients infectés (Evans et al., 2007; Koutsoudakis et al., 2007; Molina et al., 2008; Zeisel et al., 2007; Zhang et al., 2004a). Les VHCpp et VHCcc ont d'ailleurs un tropisme préférentiel pour les lignées hépatiques humaines exprimant CD81 (Bartosch et al., 2003c; Cormier et al., 2004b; Evans et al., 2007; Flint et al., 2006; Hsu et al., 2003; Lavillette et al., 2005b; Lindenbach et al., 2005; Lindenbach et al., 2006; Wakita et al., 2005; Zhang et al., 2004a; Zhong et al., 2005) et CD81 est nécessaire à l'entrée des VHCpp de tous les génotypes (Lavillette et al., 2005b; McKeating et al., 2004). Cependant, il semblerait que l'affinité de E2 pour CD81 diffère selon le génotype viral (Roccasecca et al., 2003; Shaw et al., 2003; Yagnik et al., 2000). Enfin, l'expression ectopique de CD81 humaine dans les cellules hépatocytaires humaines HepG2, qui n'expriment pas de CD81, permet de les rendre permissives aux VHCpp ou VHCcc (Bartosch et al., 2003c; Cormier et al., 2004b; Flint et al., 2006; Lavillette et al., 2005b; Lindenbach et al., 2005; McKeating et al., 2004; Zhang et al., 2004a).

Les résidus de CD81 importants pour son interaction avec E2

Différentes études ont contribué à identifier la région et les résidus de CD81 impliqués dans l'interaction avec E2. Il a été montré que la LEL de CD81 est la région responsable de son interaction avec E2 (Pileri et al., 1998; Zhang et al., 2004a) et que les ponts disulfures de la LEL sont nécessaires à la reconnaissance de CD81 par sE2 (Drummer et al., 2002; Petracca et al., 2000). La comparaison entre la CD81 humaine, celle du singe

vert d'Afrique et celle du tamarin a permis d'identifier le résidu F186 comme crucial pour l'interaction avec E2 (Flint et al., 1999a; Higginbottom et al., 2000; Kitadokoro et al., 2001; Meola et al., 2000; Pileri et al., 1998). En effet, la LEL de CD81 du singe vert d'Afrique, qui possède un résidu différent à cette position, ne se lie pas à sE2, alors que la LEL de CD81 du tamarin s'associe à E2 et possède le même résidu que chez l'homme. D'autres résidus présents dans le domaine formé par les hélices C et D, tels que L162, I181, I182, N184 et L185, ont également été identifiés (Drummer et al., 2002; Kitadokoro et al., 2001). Des molécules mimant l'hélice D de CD81 sont d'ailleurs capables d'inhiber compétitivement l'association entre E2 et CD81 (VanCompernelle et al., 2003).

Néanmoins, ces études ont été réalisées en utilisant des formes solubles de CD81 et de E2. Des différences d'association avec E2 ont pu être observées entre la LEL soluble et la molécule CD81 entière (Drummer et al., 2005; Flint et al., 2006). Des différences structurales existent également entre les formes tronquées et les formes natives de E2, comme expliqué précédemment. Des mutations dans la séquence de la LEL humaine (182, 184 et 186) avaient été associées à une diminution de l'interaction entre CD81 et sE2. Toutefois elles inhibent peu ou pas l'infection des VHCpp (Bertaux and Dragic, 2006; Flint et al., 2006). L'étude de Bertaux et collaborateurs suggère que d'autres régions de la molécule de CD81, comme la région C-terminale, la palmitoylation des cystéines juxtamembranaires et les résidus transmembranaires C80 et N18/E219 seraient importants pour l'interaction avec les VHCpp (Bertaux and Dragic, 2006). La SEL de CD81 pourrait également être importante pour l'infection, car elle est nécessaire à l'expression optimale de CD81 à la surface cellulaire (Masciopinto et al., 2001). Cependant, Flint et collaborateurs ont montré que des protéines chimériques de rat exprimant la LEL humaine sont capables de rendre les HepG2 permissives à l'infection des VHCpp et VHCcc, tandis que des protéines chimériques humaines exprimant la LEL de rat ne rendent pas ces cellules infectables (Flint et al., 2006). Ceci indique que la LEL est la région de CD81 qui définit l'infection par le VHC.

Les résidus de E2 importants pour son interaction avec CD81

Des régions et résidus de E2 importants pour son interaction avec CD81 ont également été identifiés (**Figure 12B**). Le site de E2 responsable de son interaction avec CD81 serait conformationnel (Drummer et al., 2006; Flint et al., 1999a; Hadlock et al., 2000). Des études réalisées avec sE2, des hétérodimères E1E2 ou des VLP ont identifié plusieurs régions de E2 importantes pour son interaction avec CD81, entre les résidus : 412-447 (Hsu et al., 2003; McCaffrey et al., 2007; Owsianka et al., 2001) ; 480-493 (Flint et al., 1999a; Owsianka et al., 2001; Patel et al., 2000) ; 528-535 (Owsianka et al., 2001; Yagnik et al., 2000) ; 544-551 (Flint et al., 1999a; Owsianka et al., 2001) ; et 613-618 (Roccasecca et al., 2003; Yagnik et al., 2000). Les régions HVR1 et HVR2 pourraient moduler l'accessibilité au

site de CD81 (Roccasecca et al., 2003) et la région localisée entre HVR1 et HVR2, G⁴³⁶WLAGLFY, serait impliquée dans l'interaction des VHCpp avec CD81 (Drummer et al., 2006). Ce motif, présentant des caractéristiques de peptide de fusion de type II, participerait à des étapes pré- et post-interaction avec CD81 et les résidus 437, 438, 441 et 442 contribueraient directement au site d'association avec CD81 (Drummer et al., 2006). La mutagenèse de E2 dans le contexte des VHCpp a également permis d'identifier les résidus participant à l'interaction de E2 avec CD81 (420, 527, 529, 530 et 535) (Owsianka et al., 2006). Par contre, à l'opposé des résultats obtenus avec la sE2, les hétérodimères E1E2 et les VLP, cette étude a montré que la région entre les résidus 474 et 495 ne participe pas directement de l'association entre E2 et CD81 (Owsianka et al., 2006). L'importance des résidus Trp⁴³⁷-Leu⁴³⁸-Leu⁴⁴¹-Phe⁴⁴² et Tyr⁵²⁷-Trp⁵²⁹-Gly⁵³⁰-Asp⁵³⁵ de E2 et Ile¹⁸¹-Ile¹⁸²-Leu¹⁸⁵-Phe¹⁸⁶ de CD81 pour l'association E2-CD81 indique que l'interaction se fait probablement entre des résidus hydrophobes présents dans les deux molécules (Drummer et al., 2006; Owsianka et al., 2006).

CD81 et la spécificité d'espèce

L'interaction entre E2 et CD81 ne requiert pas d'autres molécules étant donné que l'expression exogène de CD81 humaine dans des lignées de rat est suffisante pour l'attachement de E2 (Flint et al., 1999a). CD81 de certaines espèces, comme les tamarins et les chimpanzés, est capable d'interagir avec sE2 (Allander et al., 2000; Flint et al., 2006; Meola et al., 2000). Par contre, sE2 n'interagit pas avec CD81 issue de souris ou de rat (Allander et al., 2000; Flint et al., 2006) et l'expression de CD81 humaine dans des souris transgéniques ne permet pas l'infection par le VHC (Masciopinto et al., 2002). Il a été montré que les VHCpp n'infectent pas non plus les lignées non hépatocytaires non humaines, telles que les cellules CHO d'hamster et les cellules Cos-7 de singe vert d'Afrique (Bartosch et al., 2003c; Bartosch et al., 2003d; Lavillette et al., 2005b), même lorsque les CHO expriment la CD81 humaine (Bartosch et al., 2003d; Evans et al., 2007; Lavillette et al., 2005b). De même, les cellules hépatocytaires murines ne sont pas infectables par les VHCpp, telles que les Hepa1-6 (Zhang et al., 2004a) et les NIH-3T3 exprimant la CD81 humaine (Bartosch et al., 2003c; Cormier et al., 2004b).

Les résultats de l'infection des VHCpp sur les cellules hépatocytaires humaines HepG2 exprimant de manière ectopique la CD81 murine ne sont pas aussi clairs. Tandis que Bertaux & Dragic montrent que ces cellules ne sont pas permissives aux VHCpp (Bertaux and Dragic, 2006), les résultats de Flint et collaborateurs indiquent que les HepG2 exprimant la CD81 murine sont non seulement permissives aux VHCpp, mais également aux VHCcc (Flint et al., 2006). Cette dernière étude montre également que l'expression ectopique de CD81 de chimpanzé, de tamarin et de singe vert d'Afrique permet de rendre les HepG2

permissives aux VHCpp et VHCcc. Les CD81 de rongeurs, souris, rat et hamster permettent l'infection des VHCpp et VHCcc, mais avec des niveaux réduits par rapport à CD81 de primates, suggérant une affinité plus faible entre E2 et CD81 de rongeurs (Flint et al., 2006). Ensemble, ces résultats indiquent que CD81 n'est pas le déterminant de la spécificité d'espèces.

CD81 et la cinétique de l'entrée virale

CD81 semble jouer un rôle après l'attachement des particules virales aux cellules. L'étude de la cinétique de l'infection est possible par l'incubation des virus avec les cellules à 4°C pendant 1h. Sous ces conditions, l'attachement des virus aux cellules a lieu, mais ils n'entrent pas de manière efficace. L'entrée des particules virales dans les cellules se fait à partir du moment où les cellules sont transférées à 37°C. Des anticorps anti-CD81 inhibent l'infection des VHCpp et VHCcc lorsqu'ils sont ajoutés pendant l'attachement du virus à 4°C ou à partir du moment où les cellules sont transférées à 37°C (Cormier et al., 2004b; Evans et al., 2007; Koutsoudakis et al., 2006; Morikawa et al., 2007; Zeisel et al., 2007). De plus, l'ajout d'anticorps anti-CD81 jusqu'à 1h après le transfert des cellules à 37°C permet d'inhiber l'infection des VHCcc (Evans et al., 2007; Koutsoudakis et al., 2006; Zeisel et al., 2007). Plus spécifiquement, la $t_{1/2}$ des anticorps anti-CD81 pour inhiber l'interaction entre CD81 et les VHCpp et VHCcc est de 17 et 18 minutes, respectivement (Bertaux and Dragic, 2006; Evans et al., 2007). Par ailleurs, les anticorps anti-CD81 sont capables d'inhiber 50% de l'infection des VHCcc lorsqu'il sont ajoutés 1 heure après le transfert des cellules à 37°C, indiquant que 50% des particules virales sont déjà entrées dans les cellules après 1h d'incubation à 37°C (Koutsoudakis et al., 2006).

Le niveau d'expression de CD81 et l'entrée virale

La susceptibilité de cellules à l'infection par le VHC est étroitement liée au niveau d'expression de CD81 à leur surface (Akazawa et al., 2007; Koutsoudakis et al., 2007). Koutsoudakis et collaborateurs ont utilisé les cellules hépatocytaires Huh-7.5 et Huh-7-Lunet. Bien que ces cellules soient hautement permissives à la réplication de l'ARN viral des réplicons, elles présentent des niveaux différents d'infection par les VHCcc. En effet, le faible niveau de permissivité des cellules Huh-7-Lunet était lié à un niveau insuffisant d'expression de CD81 à la surface cellulaire. Cette étude suggère qu'un seuil d'expression de CD81 doit être limitant pour permettre l'infection par le VHC. Leurs données indiquent que les cellules qui expriment des niveaux indétectables ou faibles de CD81 à la surface sont peu ou pas infectables, tandis qu'à partir d'un certain seuil d'expression de CD81 (7×10^4 molécules/cellule), la susceptibilité à l'infection augmente rapidement. A partir d'un certain niveau d'expression de CD81, l'infectiosité n'augmente plus, suggérant que d'autres facteurs

limitent probablement l'infection (Koutsoudakis et al., 2007). Une autre étude, réalisée par Akazawa et collaborateurs, a analysé des clones cellulaires individuels issus de la dilution limite de cellules Huh-7. Ils ont ainsi isolé différents clones présentant des niveaux différents d'infectiosité par les VHCcc et VHCpp, de réplication du réplicon subgénomique JFH-1 et d'expression de CD81 à la surface. D'une manière générale, les clones négatifs pour CD81 étaient également négatifs pour l'infection par les VHCcc ; par contre, les clones positifs pour CD81 présentaient des niveaux différents de permissivité au VHC. Toutefois, l'hétérogénéité des différents clones cellulaires par rapport à la réplication de l'ARN viral, l'infectiosité et l'expression de CD81 suggèrait que d'autre (s) facteur (s), en plus de CD81, participent à la permissivité cellulaire au VHC (Akazawa et al., 2007).

CD81, la composition lipidique membranaire et l'entrée virale

La teneur en cholestérol de la membrane plasmique est également importante pour l'entrée du VHC (Kapadia et al., 2007; Lavillette et al., 2006). Il a été montré que le traitement des cellules avec la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD), une drogue qui extrait le cholestérol membranaire, induit une inhibition de l'infection par le VHC (Kapadia et al., 2007). Cette inhibition est directement liée à la diminution de la quantité de CD81 à la surface (Kapadia et al., 2007), car CD81 interagit physiquement avec le cholestérol (Charrin et al., 2003c). De plus, le réapprovisionnement des cellules en cholestérol après leur traitement avec cette drogue permet la restauration de l'infection et des niveaux d'expression de CD81 (Kapadia et al., 2007). Curieusement, le traitement des cellules avec la M β CD augmente l'expression de SR-BI dans les cellules, indiquant que l'importance de cette molécule dans l'infection doit être secondaire par rapport au rôle joué par CD81, ou alors les niveaux d'expression de surface des deux protéines nécessaires à l'infection pourraient être différents (Kapadia et al., 2007).

L'expression de CD81 à la surface cellulaire est également régulée par la composition lipidique membranaire. Les sphingolipides sont importants pour l'organisation de la membrane plasmique et ils s'associent avec le cholestérol pour former des microdomaines enrichis en lipides (*lipid rafts*). La transformation des sphingomyélines en céramides par la sphingomyelinase, enzyme présente à la surface cellulaire, influence l'entrée de certains virus. Pour le VHC, il a été montré que l'enrichissement de la membrane en céramides induit l'internalisation de CD81, inhibant l'entrée virale (Voisset et al., 2007). Les tétraspanines s'organisent à la membrane plasmique dans des microdomaines spécifiques différents des *rafts* et le cholestérol contribue à l'organisation de ces microdomaines. Les céramides pourraient alors modifier la distribution de ces microdomaines à la surface cellulaire.

Le rôle de CD81 dans l'étape d'entrée du VHC

Bien que l'implication de CD81 dans le processus d'entrée virale soit clairement établi (**Figure 11**), son rôle spécifique n'est pas encore défini. La tétraspanine CD81 pourrait contribuer à la fusion membranaire, puisque cette molécule participe à des événements de fusion dans la différenciation des myoblastes (Tachibana and Hemler, 1999) et la tétraspanine CD9 joue un rôle important dans la fusion entre les ovocytes et les spermatozoïdes pendant la fertilisation (Le Naour et al., 2000). CD81 pourrait également être impliquée dans des voies de signalisation intracellulaire qui seraient responsables de l'induction des mécanismes d'entrée virale. Par ailleurs, l'expression tissulaire de CD81 est presque ubiquitaire, alors que le tropisme du VHC est principalement restreint aux cellules hépatiques. De plus, certaines lignées hépatocytaires exprimant CD81 ne sont pas permissives aux virus (Bartosch et al., 2003d; Cormier et al., 2004b; Hsu et al., 2003; Lavillette et al., 2005b). L'ensemble de ces résultats indique que CD81 est une protéine nécessaire, mais pas suffisante pour l'entrée du VHC. Un ou plusieurs facteurs de l'hôte, encore non identifiés, serait (aient) indispensable (s) pour le déroulement de cette étape du cycle viral.

2.2.2. Le scavenger récepteur classe B de type I (SR-BI)

Le SR-BI est une protéine exprimée à la surface de nombreux tissus et types cellulaires, particulièrement dans le foie et les tissus stéroïdogéniques (Connelly and Williams, 2003; Rhoads et al., 2004). Cette protéine traverse deux fois la membrane plasmique, avec les extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques et une boucle extracellulaire, présentant neuf sites potentiels de N-glycosylation (**Figure 14**) (Rhoads and Brissette, 2004). SR-BI est un récepteur à ligands multiples incluant les LDL acétylées et oxydées et les lipoprotéines de haute densité (HDL) (Acton et al., 1996). L'incorporation cellulaire des lipoprotéines par SR-BI s'effectue en deux étapes : l'attachement au récepteur et le transfert des lipides (Connelly and Williams, 2003; Rhoads and Brissette, 2004). Ainsi, SR-BI intervient dans le métabolisme lipidique de la cellule.

En utilisant la forme sE2, Scarselli et collaborateurs ont identifié SR-BI comme un récepteur potentiel du VHC (Scarselli et al., 2002). Son rôle dans l'infection virale a été démontré par l'utilisation de VHCpp et VHCcc (Bartosch et al., 2003c; Kapadia et al., 2007; Lavillette et al., 2005b; Voisset et al., 2005). Des anticorps anti-SR-BI inhibent l'interaction de sE2, des VHCpp et des VHCcc avec SR-BI (Bartosch et al., 2003d; Catanese et al., 2007; Kapadia et al., 2007; Zeisel et al., 2007). Des anticorps dirigés contre les lipoprotéines spécifiques inhibent également l'interaction entre SR-BI et le virus, mais pas des anticorps dirigés contre les glycoprotéines E1 et E2 (Maillard et al., 2006). L'infection en absence de lipoprotéines peut aussi être inhibée par des anti-SR-BI (Catanese et al., 2007). Lorsque

l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre SR-BI permet une réduction efficace de l'expression de SR-BI à la surface des cellules hépatocytaires, l'infection est fortement inhibée (Lavillette et al., 2005b; Voisset et al., 2005; Zeisel et al., 2007). Par ailleurs, la surexpression de SR-BI et SR-BII (une isoforme de SR-BI) peut augmenter le niveau d'infection de cellules cibles par des VHCcc (Grove et al., 2007), et il semblerait que la région HVR1 de E2 soit nécessaire à la reconnaissance de SR-BI (Barth et al., 2005; Bartosch et al., 2003c; Scarselli et al., 2002).

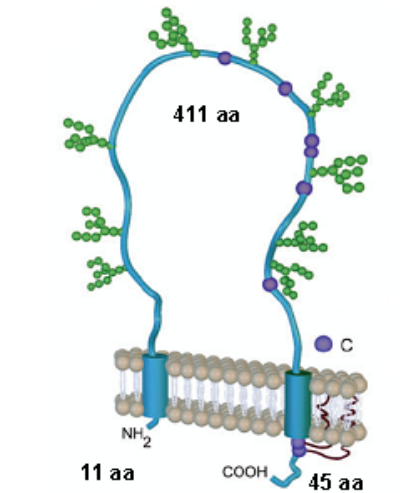


Figure 14. La structure de la protéine SR-BI.

SR-BI est constituée d'une grande boucle extracellulaire, de deux passages transmembranaires avec deux queues cytoplasmiques. La boucle extracellulaire contient neuf sites potentiels de glycosylation (en vert) et six cystéines (en violet). SR-BI est palmitoylée au niveau de deux cystéines localisées à l'extrémité C-terminale (d'après Cocquerel *et al.*, *J. Gen. Virol.* 2006).

SR-BI est un récepteur des HDL et des LDL acétylées et oxydées. Les LDL oxydées sont capables d'inhiber l'infection des VHCpp et VHCcc (von Hahn et al., 2006). Au contraire, les HDL peuvent faciliter l'entrée des VHCpp et VHCcc, de manière dépendante de la capacité de transfert lipidique de SR-BI (Bartosch et al., 2005; Dreux et al., 2006; Voisset et al., 2005). Les HDL sont également capables de réduire la neutralisation de l'infection des VHCpp et VHCcc par des anticorps dirigés contre E2 ou des anticorps purifiés à partir de sérum de patients infectés (Bartosch et al., 2005; Dreux et al., 2006; Lavillette et al., 2005a; Meunier et al., 2005; Voisset et al., 2006). L'augmentation de l'infektivité des VHCpp induite par les HDL est dépendante de l'interaction entre la région HVR1 de E2 et SR-BI (Bartosch et al., 2005; Dreux et al., 2006; Voisset et al., 2005) et les résidus L339 et G406 de cette région semblent être impliqués (Bartosch et al., 2005). L'effet stimulateur des HDL se fait par une stimulation de l'activité de transfert lipidique de SR-BI, car des drogues qui réduisent cette capacité de transfert, comme la BLT-4, annulent l'effet des HDL sur l'infection des VHCpp et VHCcc (Bartosch et al., 2005; Dreux et al., 2006; Voisset et al.,

2005; Voisset et al., 2006). Cependant, les HDL n'interagissent pas directement avec les particules virales (Bartosch et al., 2005; Dreux et al., 2006; Voisset et al., 2005). Les HDL sont formées par des lipides associés à des apolipoprotéines, mais l'utilisation des apolipoprotéines A-I et A-II libres de lipides n'a pas d'effet sur l'infection des VHCpp et des anticorps polyclonaux dirigés contre les apolipoprotéines A-I, A-II, C-II et C-III n'annulent pas l'effet des HDL (Bartosch et al., 2005; Voisset et al., 2005). Inversement, il a été proposé que l'apolipoprotéine C1 serait un des composants responsables de l'interaction des HDL avec les particules virales (Dreux et al., 2007; Meunier et al., 2005). Par ailleurs, SR-BI peut également interagir avec l'apolipoprotéine serum amyloïde A (SAA) et l'internaliser (Baranova et al., 2005; Cai et al., 2005a). La SAA est une protéine produite principalement dans le foie après une infection, un dommage tissulaire ou une inflammation (Uhlar and Whitehead, 1999), suggérant un rôle bénéfique dans la protection de l'hôte. De façon intéressante, la SAA inhibe l'entrée des VHCpp et VHCcc, en interagissant avec les particules virales, en système VHCpp (Cai et al., 2007; Lavie et al., 2006).

L'ensemble de ces observations confirme l'implication de SR-BI dans l'entrée du VHC (**Figure 11**). Cependant, sa présence dans d'autres tissus ne permet pas d'expliquer le tropisme hépatique du virus. D'autre part, il a été montré que l'étape de l'entrée du VHC au cours de laquelle SR-BI interviendrait se produirait après l'attachement du virus aux cellules cibles (Bartosch et al., 2005; Voisset et al., 2005). Récemment, Evans et collaborateurs ont montré que les VHCcc s'associent aux cellules non hépatocytaires CHO exprimant SR-BI, mais non pas aux cellules CHO exprimant CD81 ou la Claudine 1, suggérant que SR-BI pourrait intervenir avant CD81 dans le processus d'entrée (Evans et al., 2007). Plus spécifiquement, il semblerait que la participation de SR-BI et CD81 dans l'entrée virale est intimement liée et a lieu pendant la première heure de l'infection, puisque les temps d'inhibition de l'infection des VHCcc par des anticorps anti-SR-BI et anti-CD81 sont similaires (Zeisel et al., 2007). De plus, l'inhibition de l'infection induite par la co-incubation des cellules avec les deux types d'anticorps, en comparaison à des cellules incubées avec ces anticorps séparément, est encore plus importante, suggérant que SR-BI et CD81 coopèrent pendant une étape post-attachement de l'entrée du VHC (Kapadia et al., 2007; Zeisel et al., 2007). Des anti-CD81 et anti-SR-BI sont également capables d'inhiber l'entrée des VHCpp, toutefois il n'y a pas d'effet coopératif en combinaison des deux, suggérant que la coopération de SR-BI et CD81 observée pour l'inhibition de l'infection des VHCcc se passe probablement pendant une étape post-entrée (Kapadia et al., 2007). Cette étude montre que des différences existent entre les mécanismes d'entrée des VHCpp et VHCcc.

Jusqu'à présent, aucune interaction directe entre les dimères E1E2 et SR-BI n'a été décrite, suggérant que l'association du VHC avec SR-BI n'est pas directement liée à E2, mais se fait probablement par les lipoprotéines associées aux virions. Cette molécule étant

capable d'internaliser ses ligands, le virus pourrait ainsi exploiter l'activation physiologique de SR-BI par les lipoprotéines pour être endocyté (Connelly and Williams, 2003; Rhainds and Brissette, 2004).

2.2.3. Les molécules des jonctions serrées Claudines

Récemment, une banque d'ADNc de cellules hépatiques humaines a été utilisée dans le but de trouver un récepteur spécifique du VHC. Cette approche a permis l'identification d'un nouveau cofacteur nécessaire à l'entrée du virus, la Claudine-1, une protéine des jonctions serrées (**Figure 15**) (Evans et al., 2007) exprimée principalement dans le foie (Furuse et al., 1998). Cet organe exprime également d'autres claudines (Rahner et al., 2001).

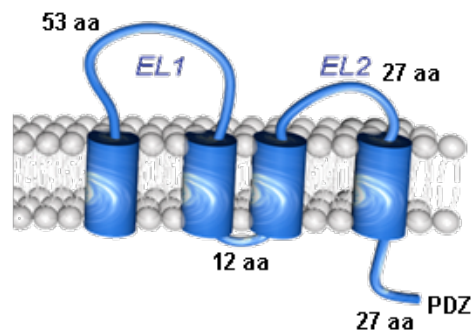


Figure 15. La structure des Claudines, protéines de jonctions serrées.

Les claudines sont constituées de quatre passages transmembranaires, une courte séquence intracellulaire N-terminale, deux domaines extracellulaires (EL1 et EL2) et une queue intracellulaire C-terminale qui peut être phosphorylée et qui permet l'interaction avec d'autres protéines par son motif PDZ.

Les jonctions serrées assurent l'étanchéité des épithéliums. Elles constituent un rapprochement étroit et localisé des membranes de deux cellules voisines, limitant le passage des solutés à travers l'espace intercellulaire (Aijaz et al., 2006; Schneeberger and Lynch, 2004). Les claudines sont les composants les plus importants des jonctions serrées. Ces protéines présentent quatre TMD, deux boucles extra-cellulaires et leurs extrémités N- et C-terminales sont dirigées vers le cytoplasme. Les domaines extracellulaires sont responsables de la perméabilité de la barrière en formation et la queue C-terminale, qui contient un motif PDZ d'interaction avec d'autres protéines, est responsable de l'ancrage au cytosquelette (Gonzalez-Mariscal et al., 2003; Van Itallie and Anderson, 2006). Ces protéines jouent un rôle crucial dans la régulation de la dynamique des flux paracellulaires et dans la maintenance de la polarité cellulaire (Gumbiner, 1993). La concentration et le type de claudines d'une jonction serrée dans un type cellulaire donné déterminent la force de la sélection de la barrière.

Certaines de ces protéines ont déjà été impliquées dans l'infection par d'autres virus : le récepteur aux coxsackievirus et aux adénovirus (CAR), impliquée dans l'entrée de ces deux virus, et la molécule d'adhésion des jonctions (JAM), importante pour l'infection des réovirus, comme les rotavirus par exemple. Pour le VHC, il a été montré que la Claudine-1 (CLDN-1) est exprimée dans différentes lignées d'hépatocarcinome et est nécessaire à l'entrée des VHCpp et VHCcc (Evans et al., 2007; Meertens et al., 2008; Zheng et al., 2007) (**Figure 11**). La réduction de l'expression de CLDN-1 dans les cellules hépatiques par des ARN interférents entraîne une diminution de l'infection par des VHCpp et VHCcc, mais la surexpression de CLDN-1 n'augmente pas l'infectiosité (Evans et al., 2007). Des anticorps dirigés contre un épitope inséré dans la première boucle extracellulaire de la CLDN-1 sont également capables de bloquer l'infection par le VHC de façon dose-dépendante (Evans et al., 2007). Des cinétiques d'inhibition suggèrent que la CLDN-1 agit plus d'une heure après la fixation du virus sur les cellules, avec une $t_{1/2}$ d'inhibition de l'infection par les VHCcc de 73 minutes, indiquant que cette molécule agit après SR-BI et CD81 dans l'entrée virale (Evans et al., 2007). De plus, il a été montré que CLDN-1 s'associe à CD81 et LDL-R à la membrane plasmique et dans le cytoplasme des cellules, et que lorsqu'elle est surexprimée, elle interagit également avec E1 et E2 du VHC (Harris et al., 2008; Yang et al., 2008). La CLDN-1 est capable de s'associer aux tétraspanines CD81 et CD151, probablement d'une manière indirecte via son interaction avec la tétraspanine CD9 (Kovalenko et al., 2007).

Par ailleurs, d'autres claudines, comme les CLDN-6 et -9, semblent également être impliquées dans l'infection par le VHC (Meertens et al., 2008; Zheng et al., 2007). Toutefois, bien que les ARN messagers des CLDN-6 et -9 soient présents dans des lignées hépatocytaires et dans les PBMCs (Meertens et al., 2008; Zheng et al., 2007), aucune expression protéique n'a été détectée dans les lignées hépatocytaires analysées (Meertens et al., 2008). De manière intéressante, l'expression de CLDN-1 dans certaines lignées non-hépatiques, telles que les HEK-293T et SW13, les rend permissives à l'infection par les VHCpp et VHCcc (Evans et al., 2007; Yang et al., 2008) et l'expression des CLDN-1, -6 et -9 présente le même effet pour l'infection par des VHCpp de différents génotypes (Meertens et al., 2008). Ainsi, c'est la première fois que l'expression d'une protéine permet de rendre des cellules non-hépatiques permissives au VHC. L'entrée des VHCpp dans les cellules HEK-293T exprimant les CLDN-1, -6 ou -9 peut être inhibée par du sérum de patient VHC positif, par un anticorps anti-CD81 et par la diminution de l'acidité des endosomes via le traitement des cellules par la bafilomycine A1 (Meertens et al., 2008), suggérant que l'expression des CLDN ne modifie pas l'importance de CD81 et de l'acidification endosomal pour l'infection.

La majorité des claudines présente une grande homologie de séquence en acides aminés, spécialement les CLDN-6 et -9, qui diffèrent d'un seul acide aminé. Ces protéines sont phylogénétiquement plus proches des claudines 3 et 4, et la CLDN-1 est plus proche de

la claudine 7 (Zheng et al., 2007). Les homologies de séquences ne peuvent donc pas expliquer la capacité des CLDN-1, -6 et -9 à conférer l'entrée au VHC, indiquant qu'un motif tridimensionnel ou l'interaction avec d'autres composants cellulaires pourraient permettre l'infection (Meertens et al., 2008). Par contre, l'alignement des séquences en acides aminés des CLDN-3, -6 et -9 humaines ont permis l'identification de quatre résidus pouvant jouer un rôle dans l'entrée virale. Néanmoins, bien que la claudine 3 présente une grande homologie de séquence avec les CLDN-6 et -9, elle n'est pas capable de conférer une sensibilité au VHC dans les cellules HEK-293T. Les études par mutagenèse de ces quatre positions indiquent que les résidus N38 et V45 de la CLDN-9 sont importants pour l'entrée des VHCpp (Zheng et al., 2007). De plus, les positions I32 et E48, critiques pour l'infection par le VHC dans les cellules qui expriment la CLDN-1 (Evans et al., 2007), sont également importantes pour la CLDN-9 (Zheng et al., 2007).

D'autre part, Meertens et collaborateurs ont exprimé les CLDN-1, -6 et -9 dans deux lignées hépatocytaires, H1H et NKNT3. Ces lignées expriment CD81, mais sont résistantes à l'infection du VHC. L'expression de la CLDN-1 a permis une infection des VHCpp-1a et 1b dans ces cellules. Par contre, l'entrée médiée par la CLDN-6 était faible et détectable uniquement pour le génotype 1a, alors que les cellules exprimant la CLDN-9 restaient non infectables (Meertens et al., 2008). De plus, l'expression exogène des CLDN-6 et -9 dans les cellules hépatocytaires Huh-7 suivie d'un traitement avec des ARN interférents dirigés contre la CLDN-1 ne permet pas la restauration de l'infection par des VHCcc et VHCpp (Meertens et al., 2008). Ces résultats, liés au fait que certaines lignées cellulaires, comme les cellules HeLa, exprimant la CLDN-1 (en plus de CD81 et SR-BI) demeurent résistantes à l'infection (Evans et al., 2007), suggèrent que d'autres facteurs cellulaires modulent la fonction des claudines dans l'entrée du VHC. Le rôle exact des claudines reste donc à élucider.

Les hépatocytes sont des cellules hautement polarisées (**Figure 16**) : le pôle basolatéral, en contact avec les capillaires sinusoides, est responsable de la sécrétion des protéines du sérum, par exemple, tandis que le pôle apical, en contact avec les canalicules biliaires, est responsable de la sécrétion de la bile. Le VHC entre dans le foie probablement par les capillaires sinusoides, accédant d'abord aux pôles basolatéraux des hépatocytes. Les complexes virus-récepteurs pourraient alors migrer de la surface latérale des hépatocytes aux jonctions serrées présentes à la surface apicale de ces cellules, où l'interaction avec les claudines permettrait l'endocytose (Meertens et al., 2008). Dans ce sens, plusieurs protéines codées par des pathogènes ont été décrites comme responsables de l'interruption de l'intégrité des jonctions serrées pour faciliter l'accès à l'hôte. L'entérotoxine de *Clostridium perfringens* dissocie les claudines 3 et 4 des jonctions serrées permettant l'invasion de la bactérie (Sonoda et al., 1999) ; la protéine CagA d'*Helicobacter*

pylori dissocie les protéines des jonctions serrées et les molécules d'adhésion, induisant des altérations du pôle apical pendant l'entrée de la bactérie dans les cellules (Amieva et al., 2003) ; et une protéine des adénovirus dissocie l'intégrité des jonctions serrées pendant la sécrétion virale (Walters et al., 2002).

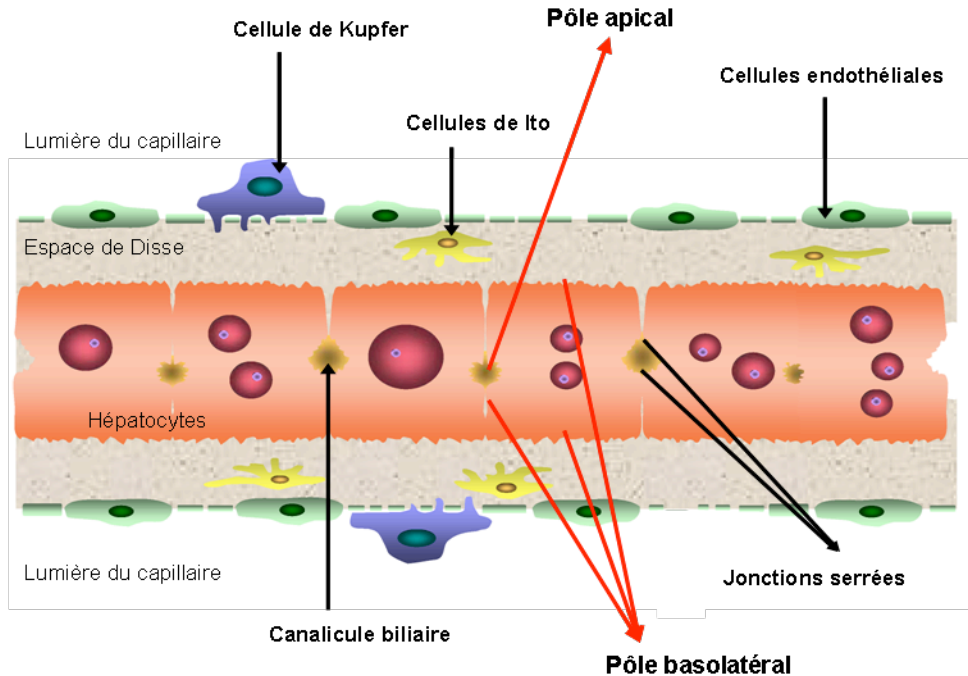


Figure 16. Représentation schématique du parenchyme hépatique.

Les surfaces baso-latérales des hépatocytes sont en contact avec les capillaires sinusoides bordés par des cellules endothéliales fenêtrées et avec les autres hépatocytes, alors que les surfaces apicales sont en contact avec les canalicules biliaires, formés par les parois des hépatocytes et délimités par des jonctions serrées. Dans la lumière des capillaires, il existe des cellules de Kupfer, les macrophages hépatiques, et dans l'espace de Disse, des cellules de Ito, qui stockent des graisses. Certains hépatocytes sont multinucléés.

Pour le VHC, une étude récente sur des cellules polarisées d'adénocarcinome colorectal Caco-2 montre que les VHCpp les infectent préférentiellement via la surface apicale en comparaison avec le pôle basolatéral (Mee et al., 2008). Par contre, l'expression de CD81, SR-BI et CLDN-1 est plus importante à la surface basolatérale des cellules Caco-2 polarisées (Mee et al., 2008). Dans les tissus hépatiques (normaux ou infectés par le VHC), la CLDN-1 est exprimée, en plus des jonctions serrées, dans les surfaces apicale et basolatérale des hépatocytes et elle colocalise avec CD81 dans ces deux régions (Harris et al., 2008; Reynolds et al., 2008). La queue cytoplasmique C-terminale de la CLDN-1, ainsi que la palmitoylation ne sont pas nécessaires à l'entrée des VHCpp (Evans et al., 2007; Harris et al., 2008). La queue cytoplasmique C-terminale est importante pour la médiation des interactions avec d'autres protéines des jonctions serrées, et la palmitoylation pourrait réguler l'interaction avec d'autres protéines ou diriger la molécule vers des régions spécifiques à la membrane plasmique (Heiskala et al., 2001; Van Itallie and Anderson,

2006). Ceci indique que la formation des jonctions serrées n'est pas essentielle à l'entrée virale. De plus, la queue cytoplasmique C-terminale de la CLDN-1 n'est pas nécessaire à son association avec CD81, suggérant que la forme de CLDN-1 qui interagit avec CD81 n'est pas associée à d'autres protéines des jonctions serrées (Harris et al., 2008). Dans ce sens, CLDN-1 s'associe également aux tétraspanines CD9, CD81 et CD151 en dehors des jonctions serrées (Kovalenko et al., 2007). L'ensemble de ces données donnent des indications supplémentaires sur le mécanisme d'entrée du VHC, mais ne permettent pas encore d'expliquer le mécanisme précis de l'entrée du VHC dans les hépatocytes.

2.3. L'internalisation du VHC

Les virus enveloppés peuvent entrer dans leurs cellules cibles selon deux stratégies. Certains, comme le VIH et la plupart des rétrovirus, pénètrent dans le cytoplasme des cellules hôtes en fusionnant directement leur enveloppe avec la membrane plasmique. Ce processus est indépendant du pH et les changements conformationnels des protéines d'enveloppe nécessaires à la fusion sont induits par une interaction directe de ces protéines avec leurs récepteurs. D'autres virus enveloppés entrent dans leurs cellules cibles par endocytose. De façon simplifiée, on distingue quatre voies d'endocytose : la voie dépendante de la clathrine, la voie dépendante des cavéoles, la voie non clathrine/non cavéole et la macropinocytose (**Figure 17**) (Pelkmans and Helenius, 2003). La voie d'endocytose dépendante de la clathrine est empruntée, par exemple, par le virus de la forêt de Semliki, les adénovirus (non-enveloppés), le virus influenza et le virus de la stomatite vésiculaire (Pelkmans and Helenius, 2003). L'exemple type de virus utilisant la voie des cavéoles est le virus simien 40 (SV40), un virus non-enveloppé ; mais d'autres virus ont été décrits, comme le virus ebola (Pelkmans and Helenius, 2002). La voie non clathrine/non cavéole pourrait servir au SV40 comme un moyen alternatif d'entrée dans les cellules (Pelkmans and Helenius, 2003). Enfin, récemment il a été montré que le virus de la vaccine utilise la voie de la macropinocytose (Mercer and Helenius, 2008). Une fois internalisés, les virus sont dirigés vers les compartiments intracellulaires spécifiques dans lesquels la capsid est libérée par fusion des membranes virale et endosomale ou par lyse membranaire.

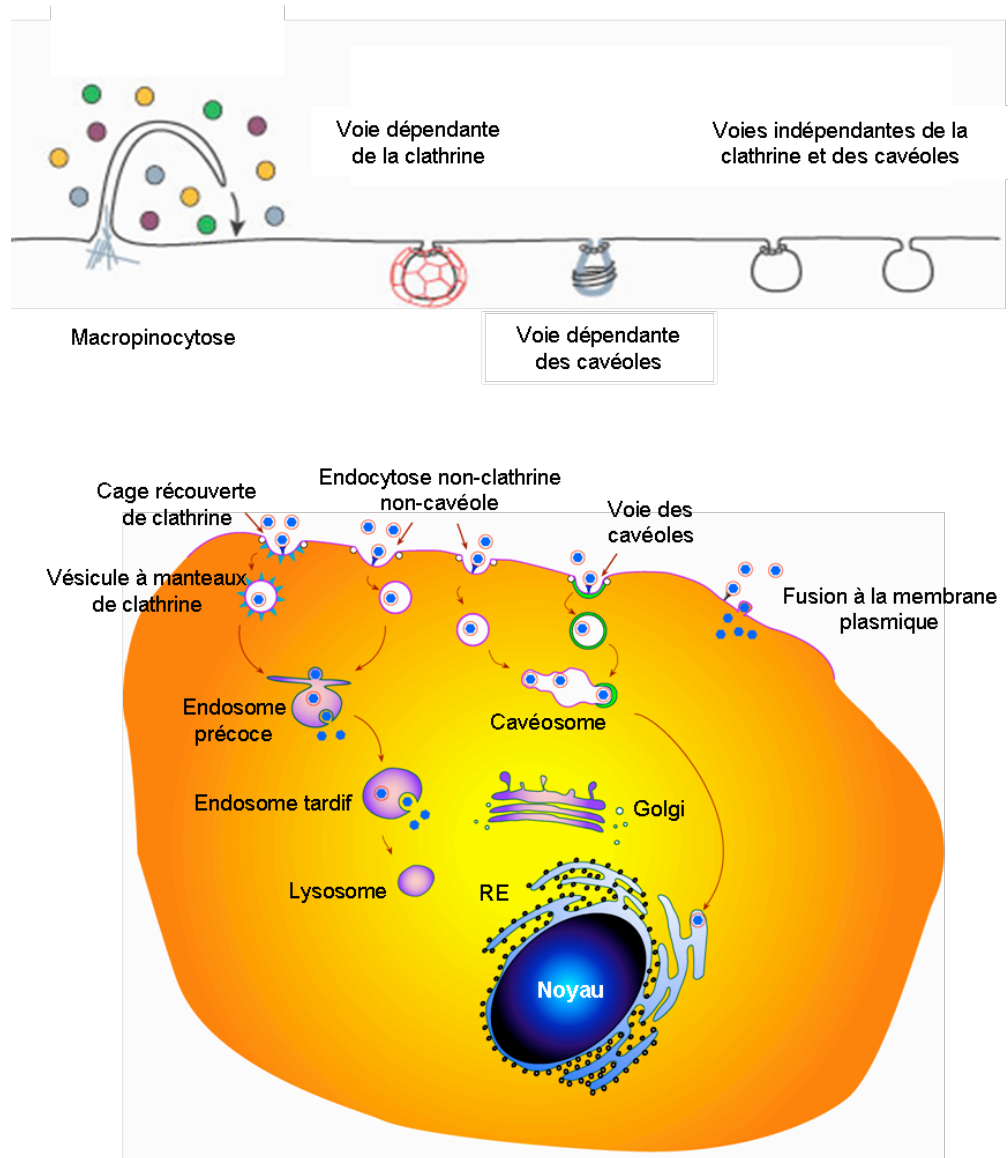


Figure 17. Voies d'endocytose empruntées par les virus.

Les virus exploitent différentes voies d'internalisation. La macropinocytose est un processus d'internalisation induit de façon non-spécifique. Les virus sont endocytés dans une vacuole, appelée macropinosome. La voie dépendante de la clathrine est souvent utilisée par les virus, tels que le VHC. Une cage recouverte de clathrine est formée par invagination de la membrane plasmique et se détache formant les vésicules à manteaux de clathrine. Le VHC et d'autres virus sont ainsi délivrés aux endosomes précoces. La voie d'internalisation par les cavéoles est dépendante de la présence de radeaux lipidiques. Les cavéoles fusionnent ensemble formant le cavéosome et les virus internalisés par cette voie sont transportés jusqu'au RE. Une voie non-clathrine et non-cavéole mais dépendante des radeaux lipidiques est également utilisée par certains virus. La plupart des voies mènent aux endosomes précoces et les virus peuvent alors fusionner dans ce compartiment sous l'influence du pH acide, ou bien accéder à l'endosome tardif, où il va fusionner.

L'utilisation d'inhibiteurs de l'acidification des endosomes, tels que la bafilomycine A1, la concanamycine A, le chlorure d'ammonium ou encore la chloroquine, a permis de montrer que l'entrée des VHCpp (Bartosch et al., 2003d; Hsu et al., 2003; Meertens et al., 2006) et des VHCcc (Blanchard et al., 2006; Koutsoudakis et al., 2006; Tscherné et al., 2006) était dépendante du pH, suggérant que le VHC entre dans ses cellules cibles par endocytose

(**Figure 11**). D'autre part, la fusion des VHCpp et de liposomes est aussi dépendante du pH, avec un seuil à 6,3 et un pH optimum à 5,5 (Lavillette et al., 2006). De plus, l'utilisation de molécules ou d'ARN interférents ciblant la clathrine a permis de montrer que le VHC entre dans ses cellules hôtes par endocytose dépendante de la clathrine (Blanchard et al., 2006; Meertens et al., 2006). Finalement, l'utilisation de mutants dominants négatifs de protéines impliquées dans l'endocytose indique que le VHC fusionne avec les endosomes précoces et non avec les endosomes tardifs (Meertens et al., 2006).

Pour de nombreux virus enveloppés, le pH acide active un changement conformationnel nécessaire à l'évènement de fusion entre les membranes virale et endosomale. De tels virus sont généralement inactivés par un traitement physique à pH acide. Dans le cas du VHC, ce type de traitement n'a pas d'effet sur l'infectiosité des particules (Meertens et al., 2006; Tscherne et al., 2006). Le VHC adopte donc probablement une conformation sensible au pH acide après une (des) interaction (s) avec son (ses) récepteur (s) ou co-récepteur (s) présent (s) à la surface des cellules cibles. Un système de fusion entre les VHCpp et des liposomes a permis de montrer que la fusion était dépendante de la température et ne nécessitait pas la présence de protéines à la surface des liposomes. De plus, elle pourrait être facilitée par la présence de cholestérol (Lavillette et al., 2006). Bien que plusieurs études antérieures aient identifié des peptides potentiels de fusion dans la séquence de E1 et de E2 (Ciccaglione et al., 2001; Drummer et al., 2007; Flint et al., 1999b; Garry and Dash, 2003; Pacheco et al., 2006; Perez-Berna et al., 2006; Yagnik et al., 2000), le modèle de Lavillette et collaborateurs a permis de montrer qu'une région de E1 (résidus 270–284) et deux régions de E2 (résidus 416-430 et 600-620) participent au mécanisme de fusion du VHC (**Figure 12**) (Lavillette et al., 2007). Les auteurs suggèrent que la région dans la séquence de E1 et la deuxième région dans la séquence de E2 (600-620) seraient responsables des premières étapes de la fusion des membranes, alors que les autres régions pourraient contribuer à la fusion lors d'étapes plus tardives, telles que la déstabilisation de la membrane, la formation du pore et/ou son agrandissement. D'autre part, la mutation de certains résidus des TMD de E1 et E2 altère la propriété de fusion de ces glycoprotéines d'enveloppe (Ciczora et al., 2007).

L'étude des mécanismes de fusion du VHC avec le modèle des liposomes a permis d'identifier une molécule capable d'inhiber cette étape de l'entrée du VHC, l'arbidol (Boriskin et al., 2008; Boriskin et al., 2006; Pecheur et al., 2007). L'arbidol est une molécule antivirale à spectre large largement utilisée en Russie contre l'Influenza et qui est également capable d'inhiber la fusion de plusieurs virus enveloppés et non-enveloppés (Boriskin et al., 2008).

IV. Les tétraspanines et leurs partenaires

Les tétraspanines forment une famille de protéines membranaires conservées au cours de l'évolution. Cette famille a été découverte vers la fin des années 80 avec les clonages successifs de CD63 (Hotta et al., 1988), CD37 (Schwartz-Albiez et al., 1988), CD81 (Oren et al., 1990), CD9 (Boucheix et al., 1991) et CD53 (Wright et al., 1993), dont les séquences protéiques possédaient des homologies significatives. Certaines protéines appartenant à cette superfamille sont également exprimées chez les champignons et les invertébrés, tels que la drosophile, les schistosomes et le *Caenorhabditis elegans* (Huang et al., 2005b). De plus, des molécules ressemblant aux tétraspanines ont été identifiées chez certains protozoaires et dans des plantes (Huang et al., 2005b), indiquant qu'elles sont anciennes dans l'évolution. La conservation de l'organisation des gènes codant les tétraspanines suggère fortement que ces molécules dériveraient d'un ancêtre commun par duplication (Garcia-Espana et al., 2008; Wright et al., 1993). De multiples tétraspanines sont exprimées dans chaque organisme, par exemple, la drosophile exprime au moins 37 membres de cette famille. Chez l'homme, elles sont au nombre de 33, dont presque la moitié a été identifiée à partir de banques de séquences EST (de l'anglais, *Expressed sequence tag*), et une minorité d'entre elles a fait l'objet d'études approfondies (**Figure 18**).

Les tétraspanines sont des protéines capables d'interagir entre elles et avec d'autres molécules, appelées partenaires, pour former des complexes multimoléculaires à la surface des cellules. Cette caractéristique est importante pour un grand nombre de fonctions exercées par ces protéines. Elles jouent un rôle dans des fonctions aussi diverses que la migration, les interactions intercellulaires, la réponse immunitaire, le développement ou encore la fusion des gamètes. Certaines jouent également un rôle clé dans le processus de cancérisation et certaines pathologies infectieuses, telles que l'hépatite C, comme expliqué précédemment, le paludisme et la diphtérie.

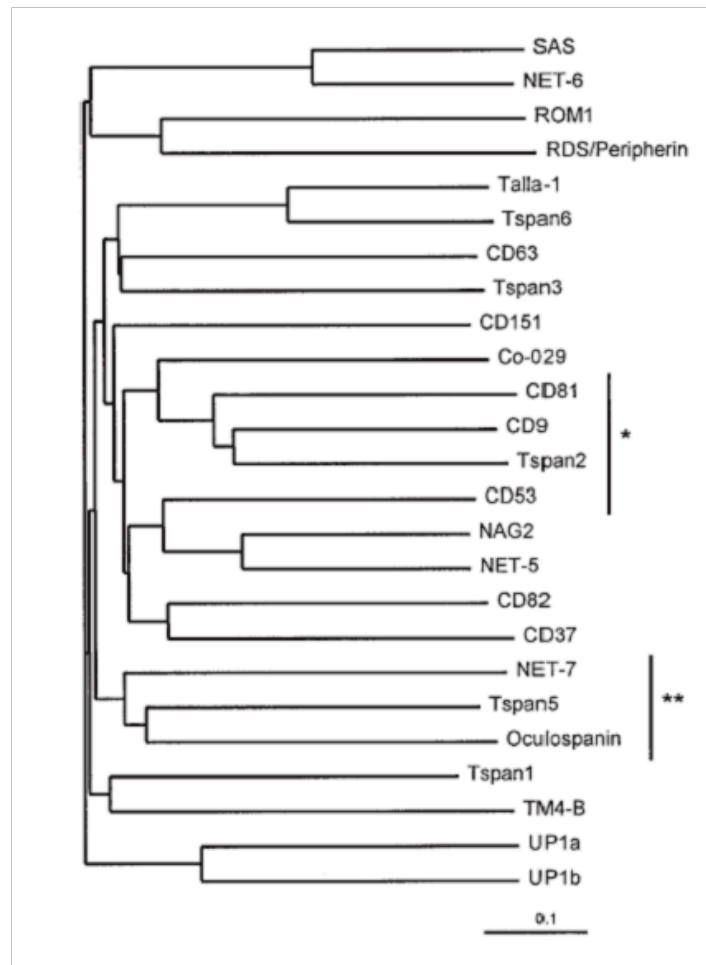


Figure 18. Arbre phylogénétique des tétraspanines de mammifères.
(d'après Boucheix & Rubinstein, *Cell. Mol. Life Sci.* 2001)

1. La structure des tétraspanines

Comme expliqué dans la partie III.2.2.1 sur CD81, les tétraspanines sont des protéines de surface cellulaire qui traversent quatre fois la membrane plasmique, avec deux boucles extracellulaires, une petite (EC1 ou SEL) et une grande (EC2 ou LEL), et des extrémités N- et C-terminales intracellulaires (**Figure 13A**). Ses protéines possèdent de 204 à 355 acides aminés ; la petite boucle comprend 20 à 28 acides aminés, tandis que la grande boucle en possède 76 à 131. Les extrémités cytoplasmiques comprennent, dans la plupart des cas, moins de 19 acides aminés, et le domaine cytoplasmique, présent entre les deuxième et troisième TMD, possède moins de 5 acides aminés. La plupart des tétraspanines sont potentiellement N-glycosylées dans la LEL, à quelques exceptions près, telles que CD9, qui est glycosylée dans la SEL (Boucheix et al., 1991), et CD81 qui n'est pas glycosylée (Oren et al., 1990). En général, les sites de glycosylation sont rarement présents dans la SEL et quand ils y sont présents, ils ne semblent pas glycosylés (Seehafer et al., 1988). Certaines tétraspanines, comme CD9, sont acylées (Seehafer et al., 1988). Les tétraspanines possèdent également des cystéines dans les régions intracellulaires

juxtamembranaires permettant leur palmitoylation (Berditchevski et al., 2002; Charrin et al., 2003b; Charrin et al., 2002; Yang et al., 2002), une modification post-traductionnelle consistant en l'ajout de palmitates sur des cystéines intracellulaires juxtamembranaires.

Chaque région structurale est associée à des fonctions spécifiques des tétraspanines. En général, les domaines extracellulaires, principalement la LEL, sont des médiateurs des interactions spécifiques avec les protéines latéralement associées et avec les ligands connus. Ils présentent d'ailleurs des divergences de séquence plus importantes que les TMD et les domaines intracellulaires (Stipp et al., 2003b). Les régions cytoplasmiques sont responsables du lien avec les molécules de la voie de signalisation et du cytosquelette. De leur côté, les quatre TMD stabilisent les tétraspanines pendant leur biosynthèse et participent aux associations entre les tétraspanines et d'autres protéines, qui sont cruciales pour l'assemblage et la maintenance du réseau de tétraspanines à la surface cellulaire. Enfin, la palmitoylation des cystéines juxtamembranaires est importante pour la formation des microdomaines à tétraspanines (Berditchevski et al., 2002; Kovalenko et al., 2004; Yang et al., 2002).

On distingue les membres de cette famille des autres protéines à quatre TMD par leurs caractéristiques communes, telles que la présence de certains résidus conservés (Levy and Shoham, 2005c). Ces caractéristiques seront détaillées par la suite.

1.1. Les domaines extracellulaires

Les domaines extracellulaires présentent une grande variabilité de taille et de séquence. Cependant, le domaine EC2 ou LEL possède des acides aminés hautement conservés, surtout plusieurs cystéines localisées à distance constante des TMD. On retrouve ainsi deux cystéines dans un motif CCG situées à environ 50 acides aminés du troisième TMD. Ces cystéines forment deux ponts disulfures avec deux autres cystéines de EC2 ; une présente dans un motif PXXC (où X représente n'importe quel acide aminé) et l'autre située 11 acides aminés en amont du quatrième TMD (**Figure 13A**). Ces cystéines sont également impliquées dans la conformation du domaine EC2 des tétraspanines. Ces protéines peuvent d'ailleurs être classées en trois groupes en fonction du nombre de ponts disulfures présents dans le domaine EC2 (Seigneuret et al., 2001) : groupe 1 avec deux ponts disulfures (CD81 et CD9) ; groupe 2, largement majoritaire, avec trois ponts (CD82 et CD151) ; et groupe 3 avec quatre.

Jusqu'à présent aucune analyse cristallographique n'a été faite sur des molécules entières de tétraspanines, du fait de la difficulté d'obtenir des quantités suffisantes de protéines actives, stables et monomériques. Par contre, la structure de la LEL de CD81 a été analysée par diffraction des rayons X après cristallisation, comme expliqué dans la partie III.2.2.1 sur CD81 (**Figure 13B**). Récemment, il a finalement été possible de produire de la

CD81 humaine entière chez la levure *Pichia pastoris*, ce qui permettra par la suite l'étude de la structure et de la fonction de CD81 par cristallographie en rayons X et par résonance magnétique nucléaire (Jamshad et al., 2008). La modélisation de la structure du domaine EC2 de plusieurs tétraspanines a permis d'obtenir une structure proche de celle observée avec le cristal de CD81, c'est-à-dire une structure conservée au niveau du « pied », avec l'insertion d'un domaine variable en taille, en séquence et en structure dans la « coiffe » (Bienstock and Barrett, 2001; Seigneuret et al., 2001). Ce domaine variable pourrait donner la spécificité à chaque tétraspanine. Dans le cas de CD81, la région variable présente la plus grande variation de séquence par rapport aux molécules des différentes espèces. Cette région pourrait également contenir le site de fixation de la glycoprotéine E2 du VHC, comme cité précédemment. Dans la même région le motif SFQ de CD9 contribue de manière essentielle à la fusion des gamètes (Zhu et al., 2002). De même, la protéine CD151 possède un motif QRD impliqué dans les interactions avec les intégrines (Kazarov et al., 2002), qui sont des récepteurs majeurs de la matrice extracellulaire formant des ponts avec le cytosquelette des cellules.

Contrairement à EC2, le rôle de EC1 est mal connu. Dans le cas de CD81, SEL servirait à maintenir le repliement et la conformation correctes de la LEL, pour une expression optimale de la protéine ou pour assister les protéines associées à être exprimées (Masciopinto et al., 2001; Yalaoui et al., 2008).

1.2. Les domaines transmembranaires

Les régions transmembranaires hydrophobes présentent des résidus polaires hautement conservés (asparagine, acide glutamique et glutamine), notamment dans les TMD 1, 3 et 4. La présence de tels résidus dans la bicouche lipidique est énergétiquement défavorable, laissant supposer qu'ils participeraient soit à la stabilisation intramoléculaire en interagissant avec des résidus polaires présents dans un des autres TMD voisins, soit à la formation de complexes avec d'autres protéines transmembranaires (Levy and Shoham, 2005c). En effet, il a été montré que les TMD de CD151 seraient plus importants que son EC2 pour établir des contacts entre deux molécules CD151 (Berditchevski et al., 2001). D'autre part, la topologie membranaire des TMD serait dépendante de la formation de ponts hydrogènes intramoléculaires entre les résidus polaires (Seigneuret, 2006). De plus, CD81 présente un motif Gly-X-X-X-Gly dans son premier TMD qui permettrait l'oligomérisation avec des protéines traversant la membrane, par des interactions entre leur régions transmembranaires (Berditchevski and Odintsova, 2007; Engelman et al., 2003; Russ and Engelman, 2000; Shoham et al., 2006).

D'autre part, l'expression en surface des tétraspanines est dépendante de leurs régions transmembranaires. Par exemple, la délétion des TMD2-3 ou des TMD4- région

cytoplasmique de CD9 empêche l'expression des mutants à la surface des cellules (Toyooka et al., 1999). De plus, des mutants des régions TMD1-2, TMD2-3 et TMD1-2-3 de CD151 sont retenus dans le RE (Berditchevski et al., 2001). Une autre étude a montré que l'expression de surface d'un mutant de CD82 sans le premier TMD pouvait être restaurée par la co-expression du domaine manquant comme un polypeptide séparé (Cannon and Cresswell, 2001). En outre, il a été montré que l'interaction entre la LEL de CD81 et le domaine extracellulaire de la protéine CD19 (Bradbury et al., 1993; Shoham et al., 2006) induit une réponse intracellulaire uniquement lorsque les deuxième et troisième TMD de CD81 sont présents (Shoham et al., 2006). Ils seraient nécessaires à la formation d'homodimères de CD81 et contribueraient ainsi à organiser les interactions membranaires permettant son association avec CD19. De plus, le premier TMD de CD81 est suffisant pour l'expression de CD19 à la surface des cellules (Shoham et al., 2006). D'autre part, certaines observations démontrent que les TMD jouent également un rôle dans la stabilisation conformationnelle de la molécule, ainsi que dans la biosynthèse des tétraspanines. Des délétions dans les TMD de CD82 engendrent en effet la rétention de la protéine au sein du RE et le repliement incorrect de EC2 (Cannon and Cresswell, 2001).

1.3. Les domaines intracellulaires

Les domaines N- et C-terminaux des tétraspanines semblent avoir un rôle clé dans le maintien des interactions entre elles et avec d'autres molécules. Ces domaines pourraient établir des interactions avec le cytosquelette ou avec des protéines de signalisation cellulaire. Ils pourraient également contribuer à définir la localisation cellulaire de ces protéines (Levy and Shoham, 2005c; Stipp et al., 2003b).

La palmitoylation des cystéines qui jouxtent les TMD serait importante pour ces fonctions. Il a en effet été montré que leur remplacement par des résidus ne pouvant pas être palmitoylés réduisait l'association des tétraspanines CD9 et CD151 avec d'autres protéines de cette famille, comme CD81 (Berditchevski et al., 2002; Charrin et al., 2003b; Charrin et al., 2002; Yang et al., 2002). En outre, la palmitoylation des cinq résidus cystéines intracellulaires de CD81 est requise pour son association avec un membre de la famille des protéines signal liant les résidus sérine/thréonine, appelé 14-3-3 (Clark et al., 2004). Cette observation suggère une implication des domaines terminaux de CD81 dans la signalisation cellulaire et montre l'importance de la palmitoylation dans cette fonction. L'état de palmitoylation des tétraspanines joue probablement un rôle dans la distribution subcellulaire et dans les associations latérales des tétraspanines avec leurs protéines partenaires (Berditchevski et al., 2002; Kovalenko et al., 2004; Yang et al., 2002).

D'autre part, les domaines cytoplasmiques des tétraspanines seraient aussi impliqués dans les interactions avec des protéines du cytosquelette, directement ou par l'intermédiaire

de protéines associées. Cela a été montré pour CD82 dans les lymphocytes T, par exemple. L'engagement de CD82 déclenche des altérations importantes de la morphologie cellulaire, des propriétés d'adhésion et de l'association entre CD82 et le cytosquelette (Lagaudriere-Gesbert et al., 1998; Zhang et al., 2001). Enfin, certaines tétraspanines, telles que CD63, CD82, CD37, CD151 et Co-029, possèdent à leur extrémité C-terminale un site potentiel d'internalisation (YXX \emptyset , où \emptyset est un acide aminé hydrophobe) (Berditchevski and Odintsova, 2007; Stipp et al., 2003b). Ce motif, absent de CD81, est responsable de l'adressage de la protéine dans les endosomes tardifs et les lysosomes.

Enfin, il a été montré que le domaine cytoplasmique N-terminal de CD81 est important pour la glycosylation correcte de son partenaire CD19 durant la maturation dans le Golgi de lymphocytes B (Shoham et al., 2003; Shoham et al., 2006). En effet, l'absence de CD81 diminue le niveau d'expression de la forme totalement glycosylée de CD19, mais pas de la forme sensible à l'enzyme endoglycosidase H (endo-H). La sensibilité à l'endo-H marque les glycoprotéines n'ayant pas atteint l'appareil de Golgi. CD81 servirait de protéine chaperon lors du transport de CD19 vers la membrane cellulaire (Shoham et al., 2003; Shoham et al., 2006).

2. Les microdomaines enrichis en tétraspanines

La caractéristique majeure des tétraspanines est leur capacité d'association avec d'autres tétraspanines, mais également avec d'autres molécules pour former des complexes multimoléculaires à la surface des cellules, la toile de tétraspanines ou le *tetraspanin web* (Boucheix and Rubinstein, 2001) (**Figure 19A**).

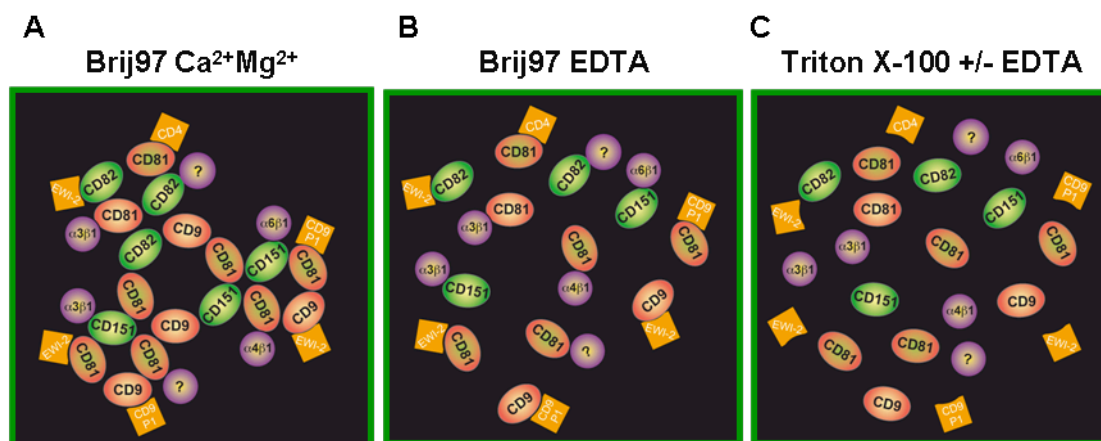


Figure 19. L'organisation du réseau de tétraspanines à la surface cellulaire selon le détergent utilisé pour lyser les cellules.

A) Dans une solution contenant 1% de Brij97 et des ions divalents, le *tetraspanin web* reste intact. **B)** Dans une solution contenant 1% de Brij97 additionné de 2mM d'EDTA, le *tetraspanin web* est dissocié mais les complexes primaires restent intacts. **C)** Dans une solution contenant 1% de Triton X-100 additionné ou non d'EDTA, les *tetraspanin web* et les complexes primaires sont dissociés.

Parmi les protéines associées aux tétraspanines, appelées partenaires moléculaires, on retrouve des molécules d'adhésion, dont certaines intégrines ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$), les protéines EpCAM, CD44 et CD46, et des molécules de la superfamille des immunoglobulines (EWI-F, EWI-2, EWI-3, EWI-101, CD19, MHC I, MHC II et CD4). Des enzymes, des protéines de signalisation (PKC α et PKC β II, protéines G hétérotrimériques et PIK4) et des précurseurs de facteurs de croissance (HB-EGF et TGF α) sont également associés aux tétraspanines (Hemler, 2005; Le Naour et al., 2006; Levy and Shoham, 2005b). Il est important de noter que le *tetraspanin web* est cellule- et tissu-spécifique. Ainsi, dans chaque type cellulaire le réseau est composé de différentes tétraspanines associées à différents partenaires, ce qui caractérise les fonctions liées aux tétraspanines spécifiques de chaque type cellulaire.

L'étude de la composition de complexes à tétraspanines repose principalement sur les techniques de co-immunoprécipitation et d'analyse par western-blot, après lyse des cellules par différents détergents. Notamment, après lyse des cellules avec des détergents comme le CHAPS, le Brij58, le Brij96, le Brij97 et le Brij98, le profil de molécules co-immunoprécipitées est identique d'une tétraspanine à l'autre pour un type cellulaire donné. Ces détergents doux préservent les interactions entre les protéines composantes du *tetraspanin web* de ce type cellulaire (Rubinstein et al., 1996; Serru et al., 1999) (**Figure 19A**). Au contraire, les profils obtenus après lyse des cellules par la digitonine et parfois le Triton X-100 ou le NP40 indiquent que ces détergents durs ne permettent plus d'observer les interactions entre les protéines du *tetraspanin web* (Serru et al., 1999) (**Figure 19C**). De plus, l'ajout de EDTA aux détergents doux permet de dissocier les interactions entre les tétraspanines, mais de garder intacts les associations entre les tétraspanines et leurs protéines partenaires (Charrin et al., 2002) (**Figure 19B**). Ces complexes, appelés complexes primaires, sont constitués d'une tétraspanine associée à un nombre limité de partenaires. Selon le modèle du *tetraspanin web*, les interactions tétraspanine/tétraspanine, dites secondaires, permettent l'assemblage des complexes primaires en complexes d'ordre supérieur qui constituent la toile des tétraspanines (Serru et al., 1999) (**Figure 19A**). Les interactions secondaires, celles qui se font tard dans la voie de biosynthèse, dans le Golgi ou post-Golgi, ne nécessitent pas le domaine EC2 et sont stabilisées ou promues par la palmitoylation des tétraspanines. La capacité d'association protéique des tétraspanines est importante pour le rôle d'organisateur de larges complexes multimoléculaires formant le *tetraspanin web*.

Les interactions entre les tétraspanines se font au sein d'un environnement lipidique particulier. En effet, les tétraspanines colocalisent avec les gangliosides (Claas et al., 2001; Delaguillaumie et al., 2004; Odintsova et al., 2003). Notamment, CD9 s'associe directement au ganglioside GM3 (Ono et al., 2001) et plusieurs tétraspanines, incluant CD9, CD81 et

CD82, s'associent directement au cholestérol membranaire (Charrin et al., 2003c). De plus, plusieurs études ont montré que les complexes à tétraspanines sont distribués, au moins en partie, dans les fractions légères, riches en lipides, après centrifugation en gradient de sucrose (Charrin et al., 2003b; Cherukuri et al., 2004a; Cherukuri et al., 2004b; Claas et al., 2001; Delaguillaumie et al., 2004). Cette distribution est encore plus importante pour les détergents qui préservent les interactions entre les tétraspanines, suggérant le concept de microdomaines enrichis en tétraspanines (TEM). Ces microdomaines membranaires pourraient se former par l'interaction entre les protéines et les lipides. Il a été d'ailleurs montré que la palmitoylation de protéines peut réguler ce type d'interaction (Bijlmakers and Marsh, 2003). Les TEM présentent des analogies avec les radeaux lipidiques classiques (*rafts*) par la présence du cholestérol et de gangliosides, ainsi que par leur présence dans les fractions légères en gradient de sucrose. Cependant, les microdomaines à tétraspanines présentent des caractéristiques qui les distinguent des *rafts* classiques. Ils sont notamment en majeure partie dissociés lors de la lyse en présence de Triton X-100 à 4°C, alors que les *rafts* sont typiquement résistants dans ces mêmes conditions (Charrin et al., 2003b; Claas et al., 2001). Au contraire, l'intégrité des TEM est maintenue en présence de Brij97 à 37°C, condition qui dissocie les *rafts* (Charrin et al., 2003b; Claas et al., 2001). De plus, des protéines classiquement associées aux *rafts*, comme les protéines membranaires à ancrage GPI ou la cavéoline, ne sont pas retrouvées dans les TEM (Berditchevski et al., 2002).

Les mécanismes d'interaction entre tétraspanines ne sont pas complètement caractérisés, mais des progrès importants ont été réalisés ces dernières années. Le cholestérol membranaire, comme expliqué précédemment, participe à l'organisation des TEM en s'associant directement aux tétraspanines (Charrin et al., 2003b). En effet, la digitonine, qui précipite le cholestérol, est capable de précipiter les TEM. Claas et collaborateurs ont montré que l'ajout de méthyl- β -cyclodextrine (M β CB) dans le milieu de culture pour extraire le cholestérol membranaire ne modifie pas les interactions entre tétraspanines à la surface des cellules, mais entraîne l'exocytose de vésicules membranaires contenant plusieurs tétraspanines (Claas et al., 2001). En revanche, l'ajout de M β CB au moment de la lyse des cellules par un détergent qui maintient les interactions entre tétraspanines a pour effet de dissocier ces interactions à l'exception de l'interaction entre CD9 et CD81 (Charrin et al., 2003c). Récemment, Silvie et collaborateurs ont analysé le rôle du cholestérol dans les interactions entre tétraspanines à l'aide d'un anticorps dirigé contre la CD81 murine (MT81w) qui reconnaît cette molécule uniquement lorsqu'elle est associée aux autres tétraspanines (**Figure 20**). Les auteurs ont ainsi mis en évidence que l'ajout de M β CB dans le milieu de culture diminue la reconnaissance du CD81 par cet anticorps sans modifier la quantité globale de CD81. Le réapprovisionnement des cellules avec du cholestérol inverse cet effet. De plus, l'ajout de cholestérol sans traitement préalable avec de

la M β CB augmente le marquage par cet anticorps, indiquant que le cholestérol est bien impliqué dans la localisation de CD81 dans les complexes à tétraspanines et que le cholestérol est important pour l'organisation des TEM (Silvie et al., 2006a).

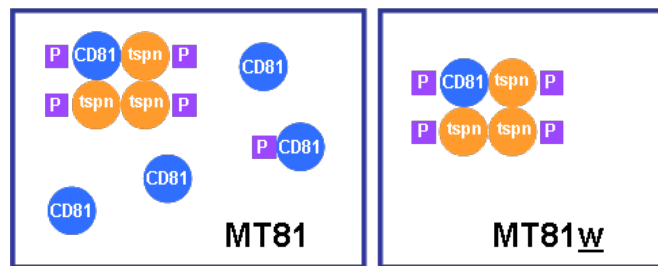


Figure 20. Schéma de reconnaissance de la CD81 murine par les anticorps monoclonaux MT81 et MT81 \underline{w} .

L'anticorps MT81 reconnaît la population globale de la CD81 murine (mCD81) dans les cellules. A l'inverse, l'anticorps MT81 \underline{w} ne reconnaît que la population de mCD81 associée aux *tetraspanin web*.

Une autre caractéristique des tétraspanines qui favorise les interactions entre ces protéines est la palmitoylation, comme cité précédemment. Plusieurs études ont montré que les tétraspanines sont palmitoylées sur plusieurs cystéines (Berditchevski et al., 2001; Charrin et al., 2002; Levy et al., 1991; Seehafer et al., 1988; Yang et al., 2002). La palmitoylation est également importante pour la localisation des multimères dans les cellules. En effet, le marquage des cellules avec un anticorps anti-CD9 de faible affinité, le C9BB, qui la reconnaît uniquement lorsqu'elle est associée en homodimères et hétérodimères indique que les multimères de CD9 sont concentrés aux contacts intercellulaires (Yang et al., 2006). Par contre, le mutant de CD9 déficient en palmitoylation présente un marquage diffus de cet anticorps à la surface (Yang et al., 2006). L'absence de palmitoylation de CD9 semble être favorable à son interaction avec son partenaire EWI-2 (Yang et al., 2006). Deux autres études suggèrent que la palmitoylation de CD81 est un processus dynamique lié à l'activité biologique de la cellule. En effet, la stimulation des lymphocytes B s'accompagne d'une augmentation de la palmitoylation de CD81 (Cherukuri et al., 2004a) et l'association de CD81 avec l'isoforme ϵ de la protéine 14-3-3 n'intervient qu'en cas de stress oxydant qui inhibe la palmitoylation de CD81 (Clark et al., 2004). La palmitoylation de CD82 semble également nécessaire à son effet inhibiteur de la migration des cellules PC3, dérivées d'un cancer de prostate (Zhou et al., 2004).

Parmi les molécules associées aux tétraspanines, il a été montré que la palmitoylation des intégrines β_4 est importante pour la localisation du complexe CD151/ $\alpha_6\beta_4$ dans les microdomaines, sans être nécessaire à l'interaction directe entre ces deux protéines (Yang et al., 2004). Dans ce sens, les intégrines qui s'associent le plus avec les tétraspanines contiennent en général des sites de palmitoylation. Les acides palmitiques

peuvent être ajoutés sur les protéines intracellulaires et de membrane par des acyl-transférases, dont les enzymes de la famille DHHC (Asp-His-His-Cys). Malgré l'importance fonctionnelle de la palmitoylation des protéines, seulement quelques cas de participation spécifique de protéines DHHC ont été décrits (Hayashi et al., 2005; Keller et al., 2004). Récemment, il a été montré qu'une enzyme de cette famille, la DHHC2, régule la palmitoylation de CD9 et CD151, sans affecter la palmitoylation de la sous-unité β_4 des intégrines (Sharma et al., 2008). Comme CD9 et/ou CD151 s'associent avec plusieurs autres tétraspanines, telles que CD37, CD53, CD63, CD81 et CD82 (Levy et al., 1998; Tachibana et al., 1997), Sharma et collaborateurs proposent que leurs cystéines seraient également palmitoylées par DHHC2, grâce à leur proximité dans le *tetraspanin web*.

Enfin, il a été proposé que la structure des TEM repose sur des briques centrales constituées d'homodimères de tétraspanines (Hemler, 2003; Kovalenko et al., 2004). L'analyse de la structure en trois dimensions du domaine LEL de CD81 a montré qu'il consiste en un dimère (Kitadokoro et al., 2001). De plus, l'utilisation de l'anticorps anti-CD9 C9BB montre que la quantité de multimères de CD9 varie selon la composition du *tetraspanin web*. En effet, lorsque CD81 et CD82 sont sur-exprimées, la multimérisation de CD9 est défavorisée, alors que lorsqu'on réduit l'expression de CD81 et CD151, il reste plus de CD9 libre, qui peut alors se multimériser (Yang et al., 2006). Néanmoins, ce modèle de briques centrales de tétraspanines n'est pas encore totalement admis au sein de la communauté scientifique. La structure de ce domaine comporte une interface hydrophobe potentiellement impliquée dans des interactions tétraspanine/tétraspanine, sans que l'on puisse exclure que cette interface soit en fait impliquée dans d'autres types d'interaction *in vivo*. Une étude récente de modélisation de la molécule CD81 entière a d'ailleurs suggérée que cette interface hydrophobe serait en fait masquée, au moins en partie, par la SEL de CD81 (Seigneuret, 2006). Il a été mis en évidence, après pontage covalent, que des homodimères CD9/CD9, CD81/CD81 et CD151/CD151, ainsi que des hétérodimères CD81/CD9, CD9/CD151 et CD81/CD151 peuvent être observés dans différents types cellulaires (Kovalenko et al., 2004). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que les tétraspanines RDS/périphérine et ROM-1 de la rétine forment des hétérodimères, qui s'assemblent en tétramères et en structures plus complexes (Goldberg et al., 1995). Au niveau de l'urothélium, les tétraspanines UPIa et UPIb s'associent avec leurs partenaires respectifs, les uroplakines UPII et UPIII, formant des hétérodimères UPIa/UPII et UPIb/UPIII. Leur association forme des structures symétriques hexagonales contenant chacune six paires d'hétérodimères UPIa/UPII-UPIb/UPIII (Hu et al., 2005; Min et al., 2006). Ces structures hexagonales constituent les plaques urothéliales caractéristiques de la surface de l'épithélium vésical (**Figure 21**) et ne correspondent donc pas au premier modèle proposé. Ces tétraspanines RDS/périphérine, ROM-1 et les uroplakines, pourraient représenter des

situations extrêmes, où elles auraient complètement perdu leur relation avec le réseau de tétraspanines pour former des tissus avec des fonctions spécialisées (Boucheix and Rubinstein, 2001). A l'heure actuelle, on ne sait pas si ce type d'organisation symétrique à la surface des cellules s'applique plus généralement aux autres types de TEM.

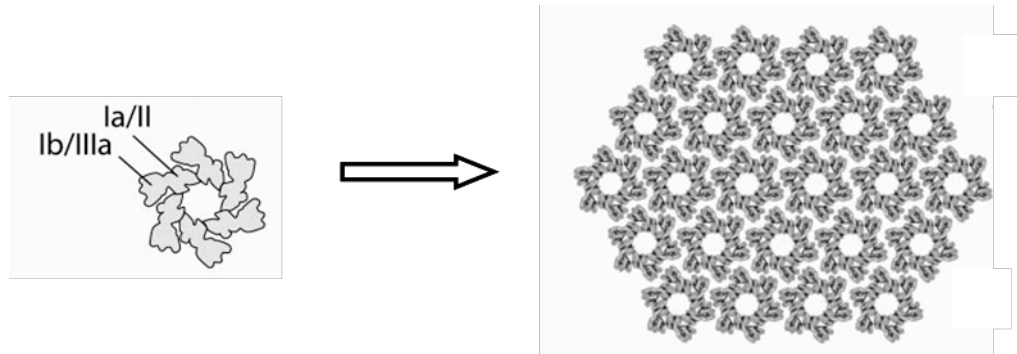


Figure 21. Modèle d'assemblage des plaques urothéliales.

Des oligomères formés par des uroplakines UPIa et UPIb et leurs partenaires UPII et UPIIIa, représenté à gauche, s'assemblent en cristaux, comme indiqué à droite (d'après Hu *et al.*, *Mol. Biol. Cell* 2005).

2.1. Les partenaires moléculaires

Les interactions entre tétraspanines et leur partenaires moléculaires pour former les complexes primaires sont directes et spécifiques (**Tableau I**).

Tétraspanines	Partenaires
UPIa	UPII
UPIb	UPIII
CD9	Pro-HB-EGF EWI-F EWI-2 EpCAM
CD63	H ⁺ K ⁺ ATPase
CD81	CD19 Intégrine $\alpha_4\beta_1$ EWI-F EWI-2
CD151	Intégrine $\alpha_3\beta_1$ Intégrine $\alpha_6\beta_1$ Intégrine $\alpha_6\beta_4$

Tableau 1. Partenaires moléculaires connus des tétraspanines.

(UP = uroplakine, HB-EGF = *heparin binding EGF-like growth factor*)

Les intégrines $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$ s'associent directement à CD151 à l'exclusion d'autres tétraspanines (Serru et al., 1999). D'autres exemples de complexes primaires sont CD81/CD19 sur les cellules lymphoïdes B (Horvath et al., 1998; Shoham et al., 2006) ou encore CD81/intégrine $\alpha_4\beta_1$ sur les leucocytes (Serru et al., 1999). EWI-F et EWI-2, deux protéines de la superfamille des immunoglobulines récemment décrites, s'associent seulement aux tétraspanines CD9 et CD81 (Charrin et al., 2003a; Charrin et al., 2001; Clark et al., 2001; Stipp et al., 2001a; Stipp et al., 2001b).

Les complexes primaires les mieux caractérisés sont ceux formés par les tétraspanines et les intégrines. En effet, plusieurs types d'intégrines peuvent interagir avec les tétraspanines, particulièrement avec CD151, et ces interactions ont lieu dans différents types cellulaires (Berditchevski, 2001; Berditchevski and Odintsova, 1999; Berditchevski et al., 1997; Boucheix and Rubinstein, 2001; Hemler et al., 1996; Yanez-Mo et al., 2001). CD151 présente des associations stables et de haute stœchiométrie avec la majorité des intégrines $\alpha_3\beta_1$ dans plusieurs lignées cellulaires et avec la majorité des intégrines α_6 dans des lignées lymphoïdes (Hemler, 2005; Serru et al., 1999; Yauch et al., 2000). CD81 est également capable d'interagir avec $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_4\beta_1$ (Berditchevski et al., 1995; Berditchevski et al., 1996; Mannion et al., 1996; Stipp and Hemler, 2000; Yanez-Mo et al., 1998) et CD9 s'associe aux intégrines $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_6\beta_4$ dans les cellules épithéliales (Baudoux et al., 2000; Jones et al., 1996; Yanez-Mo et al., 1998).

Par ailleurs, plusieurs études ont identifié des anticorps monoclonaux dirigés contre des tétraspanines dont la reconnaissance est modulée par les interactions entre les tétraspanines et les intégrines. Par exemple, un anti-CD9 la reconnaît préférentiellement lorsqu'elle est associée aux intégrines β_1 , particulièrement avec $\alpha_3\beta_1$ (Gutierrez-Lopez et al., 2003) et des anti-CD151 présentent des réactivités variables selon le démasquage/dépliage des épitopes conformationnels reconnus dans les complexes CD151/intégrines (Geary et al., 2001; Serru et al., 1999). D'autre part, l'association entre CD151 et l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ peut, par exemple, être capturée par pontage covalent. De plus, la LEL de CD151 et le domaine extracellulaire de cette intégrine sont nécessaires à leur interaction (Berditchevski et al., 2001; Yauch et al., 2000), alors que les TMD et/ou les domaines intracellulaires de CD151 seraient responsables de la régulation de la morphologie cellulaire (Zhang et al., 2002) et de l'association avec des enzymes de signalisation intracellulaire (Zhang et al., 2001). CD151 jouerait alors un rôle de lien à travers la membrane plasmique (Hemler, 1998).

Les interactions entre les tétraspanines et leur partenaires auraient lieu tôt dans le processus de biosynthèse, comme par exemple l'assemblage entre CD151 et les intégrines $\alpha_3\beta_1$ (Berditchevski et al., 2001; Kazarov et al., 2002; Shoham et al., 2006; Stipp et al.,

2003a; Tu et al., 2002; Yauch and Hemler, 2000). Un autre exemple est l'interaction entre les uroplakines UPIa/UPII et UPIb/UPIII, un pré-requis pour leur sortie du RE (Tu et al., 2002). A l'exception de la tétraspanine UPIb, les uroplakines ne sont pas capables de sortir du RE sans la formation des complexes hétérodimériques. Cependant, sans UPIII, UPIb semble ne pas avoir l'information de ciblage vers une région spécifique de la membrane plasmique de l'urothélium polarisé (Tu et al., 2002). Un autre exemple de l'importance de l'interaction entre les tétraspanines et les partenaires pour leur expression à la surface cellulaire est CD81/CD19 dans les lymphocytes B, comme cité précédemment. CD81 est non seulement nécessaire à l'expression de CD19 à la surface (Maecker and Levy, 1997; Miyazaki et al., 1997; Shoham et al., 2003; Shoham et al., 2006; Tsitsikov et al., 1997), mais elle est également importante pour la maturation de CD19 dans le Golgi (Shoham et al., 2006). Plusieurs régions de CD81, dont la LEL, les TMD et la région cytoplasmique N-terminale, sont importantes dans ces processus et CD81 serait une protéine chaperon lors du transport de CD19 vers la membrane cellulaire (Bradbury et al., 1993; Shoham et al., 2003; Shoham et al., 2006; Tsitsikov et al., 1997). Ces données supportent l'hypothèse que le *tetraspanin web* commence à s'assembler dans le RE, où les tétraspanines interagissent avec leur partenaires formant des complexes primaires. Le réseau serait ensuite formé par l'union d'autres complexes primaires le long de la voie de biosynthèse et/ou à la membrane plasmique (Berditchevski et al., 2001; Kovalenko et al., 2004; Shoham et al., 2006; Yang et al., 2004).

2.2. EWI-2 et les autres membres de la famille EWI

EWI-2/PGRL/IGSF8/CD316 appartient, avec les protéines EWI-F/CD9P-1/FPRP/CD315, EWI-101/CD101/V7 et EWI-3/IgSF3, à la famille des protéines EWI, classée dans la superfamille des Ig (**Figure 22A**) (Clark et al., 2001; Stipp et al., 2001a). Toutes les quatre se situent sur le chromosome humain 1 (Stipp et al., 2001a; Zhang et al., 2003b). La grande homologie de séquence et leur localisation génomique adjacente suggère une évolution à partir d'un ancêtre commun, par duplication génique (Zhang et al., 2003b). Les protéines EWI présentent en effet une grande similarité de séquence, entre 23 et 35%, les deux premiers domaines Ig étant les plus proches avec une similarité de 24 à 57% (**Figure 22B**). EWI-3 et EWI-101 sont plus proches entre elles, comme le sont EWI-2 et EWI-F (Stipp et al., 2001a).

La caractéristique principale de ces protéines est la présence d'un motif Glu-Trp-Ile (EWI) présent dans leur domaine extracellulaire. En plus de cette caractéristique, les ectodomains de toutes les protéines EWI sont composés exclusivement de domaines Ig de type V, ce qui est rare dans la famille des Ig en général (Stipp et al., 2001a; Zhang et al., 2003b). Ces protéines présentent un large domaine extracellulaire, un domaine

transmembranaire et une queue cytoplasmique courte et hautement chargée (**Figure 22A**). De plus, les deux domaines Ig les plus distaux des protéines EWI sont les régions présentant le plus d'homologie avec les autres protéines de la superfamille des Ig (Stipp et al., 2001a).

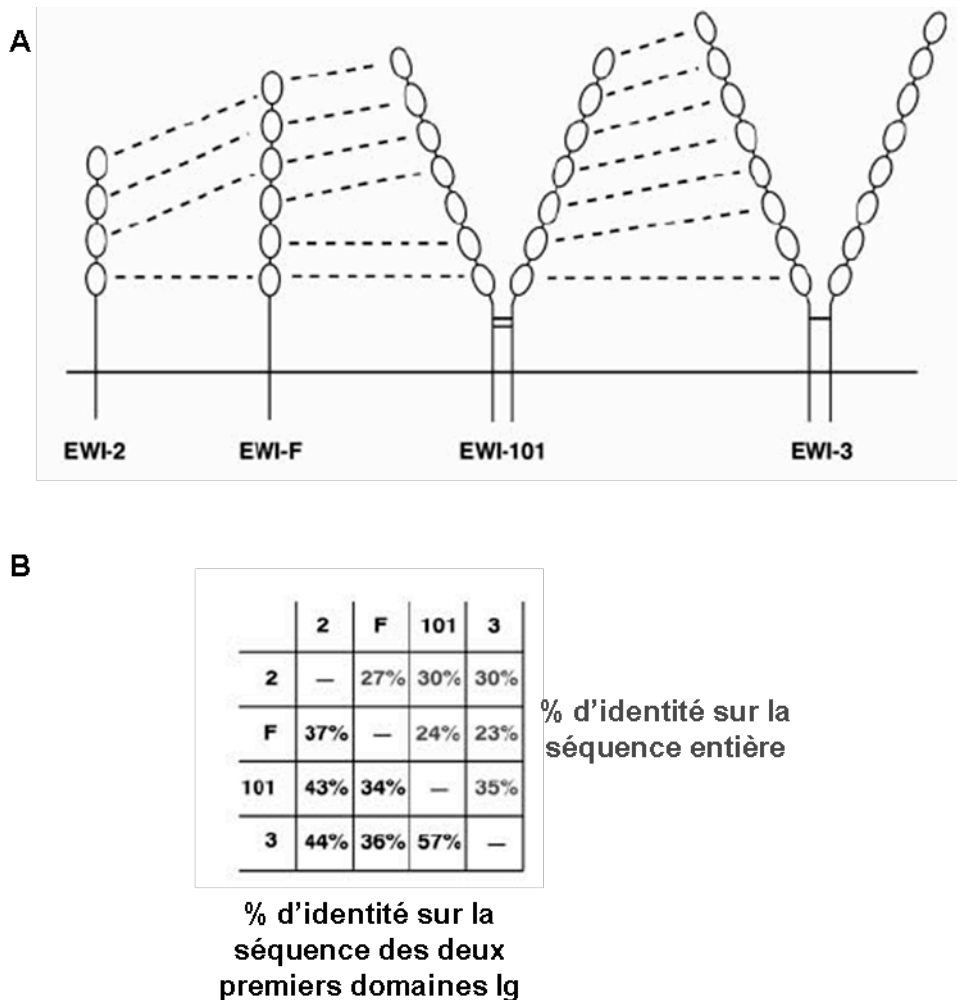


Figure 22. Les protéines partenaires de la famille EWI.

A) Les domaines Ig les plus proches des protéines EWI sont indiqués par des lignes pointillées. **B)** Les relations des protéines de cette famille ont été mesurées par le calcul du pourcentage d'identité sur l'alignement de la séquence entière, en gris, ou sur les deux premiers domaines Ig, en noir (d'après Stipp *et al.*, JBC 2001).

Plus spécifiquement, la protéine EWI-2 est une protéine présentant un domaine extracellulaire de 552 acides aminés structurés en quatre domaines Ig-like nommés Ig1 (le plus distal) à Ig4 (le plus proximal); un TMD de 21 acides aminés et une queue cytoplasmique de 10 acides aminés (**Figure 22A**) (Charrin et al., 2003a; Clark et al., 2001; Stipp et al., 2001a). La forme mature du polypeptide a une masse moléculaire prédite de 62kDa, avec 8kDa additionnels probablement dûs à la N-glycosylation des trois sites potentiels (NX(S/T)) présents dans le domaine extracellulaire (Stipp et al., 2001a; Zhang et al., 2003b).

Ces sites de N-glycosylation se situent dans le premier, le troisième et le quatrième domaines Ig d'EWI-2 (Clark et al., 2001; Stipp et al., 2001a). La principale différence entre EWI-2 et les autres protéines de la sous-famille EWI vient des domaines extracellulaires.

EWI-F, d'environ 120kDa, possède en effet six domaines Ig avec six sites potentiels de N-glycosylation et une queue cytoplasmique de 27 acides aminés (**Figure 22A**) (Charrin et al., 2001; Orlicky, 1996; Orlicky and Nordeen, 1996). Cette protéine présente également des acides sialiques (Charrin et al., 2001) et six cystéines palmitoylées (Charrin et al., 2002). EWI-101 quant à elle présente sept domaines extracellulaires avec sept sites potentiels de N-glycosylation et EWI-3, huit domaines extracellulaires (**Figure 22A**). Ces deux dernières possèdent des cystéines C-terminales supplémentaires à l'extrémité du domaine Ig final. Pour cela, elles s'organisent probablement en dimères avec des ponts disulfures entre ces cystéines (**Figure 22A**) (Gouttefangeas et al., 1994; Stipp et al., 2001a).

EWI-2 et EWI-F s'associent spécifiquement avec les tétraspanines CD9 et CD81 à la surface de différents types cellulaires, notamment les lymphocytes (Charrin et al., 2003a; Charrin et al., 2001; Clark et al., 2001; Stipp et al., 2001a; Stipp et al., 2001b). Ces associations présentent une haute stoechiométrie, avec environ 70% pour EWI-2 (Stipp et al., 2001a) et de 70 à 100% pour EWI-F (Charrin et al., 2001; Stipp et al., 2001b). La région d'EWI-2 responsable de son interaction avec ces tétraspanines est probablement présente dans l'extrémité C-terminale de la protéine. En effet, des produits de clivage d'EWI-2, d'environ 52 et 43kDa, retiennent la capacité à s'associer à CD81, indiquant que les deux domaines Ig distaux ne seraient pas nécessaires pour l'interaction avec CD81 (Charrin et al., 2003a; Kolesnikova et al., 2004; Stipp et al., 2001a). De plus, une protéine chimérique d'EWI-2 avec la queue cytoplasmique de CD2 n'interagit plus avec CD81 (Stipp et al., 2003a). Par ailleurs, dans les cellules de leucémie monocyttaire U937 déficientes en CD81, la majorité d'EWI-2 n'arrive pas à la surface cellulaire. Ceci suggère qu'en absence de CD81, EWI-2 reste dans une forme immature, non complètement glycosylée, qui n'atteint pas la surface de la cellule. CD81 interagirait alors avec EWI-2 relativement tôt dans la voie de biosynthèse, facilitant son transport à la surface cellulaire, où le complexe tétraspanine-partenaire s'associerait aux autres composants du *tetraspanin web* (Stipp et al., 2003a).

De plus, il a été montré que deux régions différentes de CD9 contribuent indépendamment pour l'interaction avec EWI-2 et que la combinaison des deux est nécessaire pour un niveau maximal d'interaction. La première région est localisée dans une région qui inclue à peu près quatorze acides aminés du second TMD, la petite séquence cytoplasmique, le troisième TMD et environ six acides aminés de l'EC2 de CD9. La deuxième région est localisée dans l'EC2, après le motif conservé CCG (Charrin et al., 2003a). La première région possède seulement 62% d'identité avec la région correspondante de CD81 et la seconde région a une pauvre similarité structurale et de

séquence avec la LEL de CD81. Ceci suggère que CD81 s'associe avec EWI-2 probablement d'une autre manière (Charrin et al., 2003a). De plus, les séquences de CD9 responsables de son interaction avec EWI-2 ne sont pas responsables de son interaction avec EWI-F. En effet, il a été montré que le domaine EC2 et/ou le quatrième TMD de CD9 étaient responsables de son interaction avec EWI-F (Charrin et al., 2001). De plus, la palmitoylation de CD9 ne serait pas nécessaire à son interaction avec EWI-F (Charrin et al., 2002).

D'autre part, aucune interaction entre EWI-101, EWI-3 et CD9/CD81 (Charrin et al., 2003a) ou entre EWI-F et CD82 (Charrin et al., 2001) n'a été montrée. Par contre, les données sur l'interaction entre EWI-2 et CD82 sont contradictoires. Tandis que Charrin et collaborateurs n'ont pas observé de co-immunoprécipitation entre ces deux protéines (Charrin et al., 2003a), Zhang et collaborateurs ont montré une telle interaction (Zhang et al., 2003b). Néanmoins, dans cette dernière étude, la majorité d'EWI-2 est associée avec CD81. L'interaction EWI-2/CD82 pourrait alors se faire via CD81. Dans tous les cas, les différences observées dans ces études peuvent venir des lignées cellulaires différentes et/ou de l'utilisation de détergents différents pour lyser les cellules.

2.2.1. L'expression tissulaire et localisation subcellulaire des protéines EWI

L'analyse de l'expression tissulaire d'EWI-2 a été faite au départ par la détection de l'ARN de cette protéine dans les différents organes (Clark et al., 2001; Kolesnikova et al., 2004; Stipp et al., 2001a; Zhang et al., 2003b). L'ARN d'EWI-2 est présent dans le cœur, les glandes surrénales, les poumons, les ovaires, les muscles, le pancréas, les testicules, l'utérus, l'estomac, le thymus, la prostate, le colon, les glandes mammaires, la rate, l'intestin grêle, les ganglions et la moelle épinière. EWI-2 est particulièrement exprimée dans le cerveau, les reins, le foie, le placenta et les testicules. La majorité de ces mêmes organes exprime l'ARN d'EWI-2 murine (Stipp et al., 2001a), qui possède 91% d'identité et 96% de similarité de séquence avec EWI-2 humaine (Clark et al., 2001; Stipp et al., 2001a). EWI-2 pourrait donc avoir des fonctions conservées parmi les différentes espèces.

Par la suite, des anticorps anti-EWI-2 ont permis de montrer qu'EWI-2 est exprimée dans les cellules du sang périphérique, telles que les cellules B, T et NK. Par contre, elle n'a pas été détectée dans les granulocytes et les plaquettes (Charrin et al., 2003a; Vidal-Laliena et al., 2005). EWI-2 est également présente dans les cellules dendritiques (Sala-Valdes et al., 2006). Ces cellules et les monocytes présentent une stimulation précoce de l'expression d'EWI-2, environ 12 heures après leur activation. L'apparition d'EWI-2 se fait avant l'expression d'autres marqueurs d'activation, qui apparaissent à partir de deux jours seulement (Kettner et al., 2007). Par ailleurs, la distribution d'EWI-2 dans les cellules immunitaires est identique à la distribution de CD81, mais différente de celle de CD9, qui est

exprimée chez les basophiles, les éosinophiles, les plaquettes et probablement chez les monocytes (Boucheix et al., 1985). De plus, EWI-2 et CD81 sont exprimées et colocalisent dans les hépatocytes humains (Charrin et al., 2003a).

Quelques études ont analysé la localisation tissulaire des autres membres de la sous-famille EWI. EWI-F, par exemple, a été détectée dans les poumons, l'utérus, les ovaires, les adipocytes, les cardiomyocytes, les ostéoclastes, les cellules lutéales, les cellules de Leydig, les cellules glandulaires mammaires, les kératinocytes et les glandes salivaires et dans certaines lignées myéloïdes (Charrin et al., 2001; Orlicky et al., 1998; Orlicky and Nordeen, 1996; Vidal-Laliena et al., 2005). EWI-F est cependant largement exprimée dans de multiples lignées cancéreuses humaines (Charrin et al., 2001). Cette différence d'expression entre les tissus normaux et cancéreux indique d'ailleurs une participation potentielle des protéines EWI dans la malignité. Les deux autres membres de la famille montrent un profil de distribution plus restreint. Il a été rapporté qu'EWI-101 serait exprimée uniquement dans les poumons et les leucocytes (Rivas et al., 1995; Ruegg et al., 1995). EWI-3, qui a été très peu étudiée jusqu'à présent, présente un spectre de distribution tissulaire intermédiaire, étant hautement exprimée dans les poumons, les reins et le placenta (Saupe et al., 1998).

Concernant sa localisation subcellulaire, EWI-F présente un marquage de type RE et trans-Golgi (Orlicky, 1996) et colocalise avec CD9 à la surface des cellules épithéliales et endothéliales (Singethan et al., 2008). EWI-2, de son côté, colocalise et interagit directement avec les protéines Ezrine, Radixine et Moesine, appelées ERM, dans les uropodes de cellules lymphoïdes. Les ERM, concentrées dans les structures riches en actine, sont impliquées dans les interactions entre la membrane plasmique et le cytosquelette. EWI-F colocalise et s'associe également avec ces protéines dans les surfaces apicales de cellules HeLa (Sala-Valdes et al., 2006). Les interactions d'EWI-2 et d'EWI-F avec les protéines ERM se font via les domaines cytoplasmiques des protéines EWI et le domaine N-terminal des protéines ezrine et moesine. De plus, il a été montré que les ERM seraient nécessaires à la localisation subcellulaire des protéines EWI. En effet, lorsque celles-ci sont co-transfectées avec un domaine N-terminal de moesin qui n'est pas capable d'interagir avec le cytosquelette, le marquage colocalisé des protéines ERM et EWI est diffus à travers la membrane plasmique. Par contre, l'utilisation d'EWI-2 avec une queue cytoplasmique tronquée ne modifie pas sa localisation intracellulaire. De manière intéressante, il a été montré que la queue cytoplasmique C-terminale de CD81 interagirait également avec le domaine N-terminal des ERM. En l'absence d'une interaction directe entre EWI-2 et ERM, cette tétraspanine serait alors responsable de la relocalisation d'EWI-2 vers les sites riches en ERM (Sala-Valdes et al., 2006).

2.2.2. Les fonctions des protéines EWI

Comme CD81, EWI-2 pourrait réguler la migration cellulaire. En effet, la surexpression de cette protéine diminue la migration de cellules de carcinome métastatique de la prostate Du154 sur la fibronectine ou la laminine (Zhang et al., 2003b). La surexpression d'EWI-2 dans des cellules de carcinome épithélial A431 induit une réduction de la réaggrégation et du taux de migration cellulaire en laminine 5 (Stipp et al., 2003a). De même, la sur-expression d'EWI-2 dans des cellules de leucémie T humaines MOLT-4 inhibe leur propagation en VCAM-1 (molécule vasculaire d'adhésion cellulaire 1), un substrat de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ (Kolesnikova et al., 2004). Dans les cellules A431, l'interaction d'EWI-2 avec l'intégrine $\alpha_3\beta_1$, un des récepteurs de la laminine 5, se fait via son association aux tétraspanines CD81 et CD9 (Stipp et al., 2003a). De manière similaire, EWI-2 interagit avec l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ dans les cellules MOLT-4, via son association avec CD81. De plus, dans les cellules MOLT-4, la surexpression d'EWI-2 induit une augmentation de l'association CD81/ $\alpha_4\beta_1$ (Kolesnikova et al., 2004). De manière importante, les niveaux d'expression des intégrines dans ces deux études n'ont pas été altérés par la surexpression d'EWI-2, ni la localisation intracellulaire de l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ dans les cellules A431. Par contre, CD81 est relocalisée à la périphérie cellulaire, surtout au niveau des filopodes, zones riches en intégrine $\alpha_3\beta_1$ (Stipp et al., 2003a). Enfin, la queue cytoplasmique d'EWI-2 n'est pas nécessaire pour la migration des cellules A431 en laminine 5 (Stipp et al., 2003a), ni des cellules MOLT-4 en VCAM-1 (Kolesnikova et al., 2004). La protéine chimérique EWI-2-CD2 est capable d'interagir avec CD9 et donc avec l'intégrine $\alpha_3\beta_1$, par contre elle n'interagit plus avec CD81 (Stipp et al., 2003a). Ces études indiquent qu'EWI-2 régule la migration, probablement via son association avec les tétraspanines et les intégrines.

De manière intéressante, la réduction de l'expression d'EWI-2 par des ARN interférents induit une augmentation de la migration cellulaire, de la migration trans-endothéliale, de la polarisation et de la fréquence des uropodes dans les cellules lymphoïdes (Sala-Valdes et al., 2006). De plus, la diminution de l'expression d'EWI-2 induit la phosphorylation des protéines ERM, qui s'associent aux filaments d'actine dans les microvillosités et d'autres protusions cellulaires. L'association entre les protéines EWI-2, EWI-F et ERM pourrait alors être responsable du lien entre les tétraspanines et le cytosquelette intracellulaire. Dans ce sens, il a été montré récemment qu'EWI-2 et EWI-F sont exprimées à la surface des ovocytes et qu'ils forment des complexes avec CD9, qui pourraient être importants pour la morphologie, la dynamique et la fonction des microvillosités de ces cellules (Runge et al., 2007).

La tétraspanine CD9 co-immunoprécipite EWI-2 aussi dans des lignées tumorales. Il a été montré que, dans certaines lignées très malignes, la co-immunoprécipitation d'EWI-2

est plus importante que dans d'autres lignées (Yang et al., 2006). De plus, le marquage de l'anticorps C9BB, qui reconnaît CD9 principalement lorsqu'elle est organisée en multimères, est réduit lorsqu'EWI-2 est sur-exprimée, indiquant qu'EWI-2 pourrait induire une diminution de l'homodimérisation de CD9. Ceci pourrait expliquer la diminution d'organisation des jonctions intercellulaires de cellules malignes (Yang et al., 2006).

Une autre étude récente a identifié EWI-2 comme un marqueur précoce d'activation des cellules dendritiques (Kettner et al., 2007). En effet, Kettner et collaborateurs ont montré que l'expression d'EWI-2 est induite par la stimulation des récepteurs *toll-like* (TLR) 2 et 4. A l'aide d'une forme soluble contenant les domaines extracellulaires d'EWI-2 fusionnés aux domaines constants de la chaîne lourde gamma des Ig humaines (sEWI-2-hlg), ils ont ainsi identifié un ligand d'EWI-2 dans les cellules Jurkat, le gène de HSPA8 variant 1. Ce gène code une protéine de choc thermique (HSP), également connue sous le nom de hsc70 ou hsc73. Le traitement de cellules Jurkat avec des ARN interférents dirigés contre HSPA8 réduit l'association de la protéine chimérique sEWI-2-hlg à ces cellules (Kettner et al., 2007). L'association d'EWI-2 est restreinte à HSPA8, car les autres HSP testées n'étaient pas reconnues. De plus, l'interaction EWI-2-HSPA8 est diminuée en présence d'ATP, qui induit des changements conformationnels dans HSPA8, ou en présence de chaleur, qui diminue les niveaux de surface des protéines HSP. Enfin, les auteurs ont montré que la migration et la capacité de présentation d'antigènes des cellules dendritiques sont modifiées par l'engagement d'EWI-2 par HSPA8 ou par un anti-EWI-2 (Kettner et al., 2007). Tandis que HSPA-8 et EWI-2 ont un effet suppresseur sur la stimulation d'antigènes, un anticorps anti-EWI-2 augmente la migration de cellules dendritiques matures uniquement vers la chimiokine SLC/CCL21 (Kettner et al., 2007).

De son côté, EWI-F a été identifiée comme une glycoprotéine membranaire des corps jaunes bovins avec des propriétés d'association avec la prostaglandine $F_{2\alpha}$ (Orlicky et al., 1990). Elle est d'ailleurs capable de s'associer au récepteur de cette prostaglandine chez le rat (Orlicky and Nordeen, 1996) et d'inhiber son association à la prostaglandine $F_{2\alpha}$ de manière dose-dépendante, non-compétitive et nécessitant l'expression à la fois du récepteur et d'EWI-F dans la même cellule (Orlicky, 1996). Cette inhibition se fait par une diminution du nombre de récepteurs, plutôt que par une réduction de son affinité (Orlicky, 1996). D'autre part, l'expression d'EWI-F dans les cellules pré-adipocytaires de souris 3T3-L1, représentatives du métabolisme des graisses, augmente durant la différenciation cellulaire (Orlicky et al., 1998). Les cellules non-différenciées n'ont présenté que l'ARNm d'EWI-F, suggérant que son expression serait régulée post-transcriptionnellement. Enfin, l'accumulation d'EWI-F est associée à l'accumulation de GL dans ces cellules (Orlicky et al., 1998). Cependant, aucune évidence que cette molécule soit capable de réguler les récepteurs à prostaglandines dans les cellules humaines n'a été apportée jusqu'à présent.

Récemment, une étude sur l'identification d'antigènes spécifiques de tumeurs, en utilisant une bibliothèque d'anticorps présentés par des phages, a identifié EWI-F dans des cellules tumorales de sein humain SK-BR-3 (Goenaga et al., 2007). Bien qu'aucun effet anti-prolifératif n'ait été observé avec l'utilisation de l'anticorps anti-EWI-F sélectionné, les auteurs ont montré qu'il est rapidement internalisé par les cellules tumorales, ce qui pourrait être utilisé par la suite pour délivrer des nanoparticules à EWI-F. Cette approche pourrait apporter des molécules cytotoxiques spécifiquement aux tumeurs (Goenaga et al., 2007).

Les fonctions des autres membres de la sous-famille des protéines EWI restent très mal connues. En effet, rien encore n'a été publié sur une fonction possible d'EWI-3. Pour EWI-101, elle est bien décrite comme un marqueur de surface de cellules immunitaires humaines, telles que les cellules T (Allez et al., 2002; Anumanthan et al., 1998; Braun et al., 2003; Fernandez et al., 2007; Rivas et al., 1995; Ruegg et al., 1995; Schiavon et al., 1996; Soares et al., 1997a; Soares et al., 1997b; Soares et al., 1998), les cellules NK (Anumanthan et al., 1998; Meyer et al., 2000), les monocytes (Kantor et al., 2007) et les cellules dendritiques (Bagot et al., 1997a; Bagot et al., 1997b; Bouloc et al., 2000b). La stimulation de EWI-101 dans les cellules dendritiques inhibe la prolifération de cellules T via la production d'interleukine 10 (Bouloc et al., 2000a), mais elle joue un rôle dans l'activation de ces cellules (Bagot et al., 1997b), induisant une inhibition de la production d'interleukine 2 par les cellules T activées (Soares et al., 1997b; Soares et al., 1998). Des résultats contradictoires existent sur la participation du gène qui code EWI-101 dans le diabète auto-immun de type 1 chez les souris non-obèses diabétiques (Maier et al., 2005; Penha-Goncalves et al., 2003; Yamaji et al., 2005).

3. L'expression tissulaire et localisation subcellulaire des tétraspanines

L'expression tissulaire est variable d'une tétraspanine à l'autre, mais de manière générale il semble que toutes les cellules de l'organisme, à l'exception des spermatozoïdes, expriment plusieurs tétraspanines (Boucheix and Rubinstein, 2001). Certaines d'entre elles, comme CD9, CD63, CD81, CD82 et CD151 sont largement exprimées dans l'organisme. En revanche, d'autres ont un spectre d'expression plus restreint. CD53, par exemple, est un marqueur leucocytaire, alors que CD37 n'est fortement exprimée que sur les cellules lymphoïdes B. D'autres tétraspanines ne sont exprimées qu'au niveau de structures tissulaires spécialisées, comme les uroplakines, constituants des plaques urothéliales, et les protéines RDS/périphérine et ROM-1, localisées uniquement dans la rétine.

Plus spécifiquement, CD81 est exprimée très tôt pendant l'embryogenèse des mammifères. L'expression de la protéine a été détectée dans des ovocytes de souris et dans des œufs fertilisés, jusqu'au stade de quatre cellules de développement (Andria et al., 1992).

CD81 est retrouvée dans à peu près tous les tissus, étant exprimé à la surface des cellules épithéliales, des fibroblastes, des cellules endothéliales et de la plupart des cellules du sang, à l'exception des érythrocytes, des plaquettes, des polynucléaires neutrophiles, ainsi que des spermatozoïdes (Boucheix and Rubinstein, 2001; Engel and Tedder, 1994; Levy et al., 1998). De manière similaire, la plupart des lignées cellulaires hématopoïétiques humaines testées expriment CD81, à l'exception des cellules monocytaires U937. L'ARNm de CD81 est également présent dans tous les tissus murins testés (Nagira et al., 1994; Tomlinson and Wright, 1996). Par contre, les niveaux d'expression peuvent varier au sein d'un même tissu sous l'effet de l'activation cellulaire. Dans les tissus lymphoïdes par exemple, CD81 est particulièrement présente dans les centres germinaux de cellules B (Levy et al., 1998). Elle est également sur-exprimée dans les éosinophiles des patients infectés avec des parasites helminthes (Mawhorter et al., 1996).

La plupart des tétraspanines sont exprimées à la surface des cellules, mais certaines, comme CD63, sont également présentes en quantités importantes dans des compartiments intracellulaires (Berditchevski and Odintsova, 1999; Sincock et al., 1999). Comme cité précédemment, les TMD des tétraspanines sont importants pour leurs expression à la surface cellulaire. Deux études ont d'ailleurs montré que le trafic des tétraspanines du RE vers le Golgi est contrôlé par la protéine chaperon du RE calnexine (Cannon and Cresswell, 2001; Rubinstein et al., 1997). Rubinstein et collaborateurs ont ainsi montré que CD9 co-immunoprécipite avec la calnexine et que cette interaction est indépendante de la sous-unité β_1 des intégrines (Rubinstein et al., 1997). L'autre étude a montré que la calnexine, mais pas la calréticuline, interagit avec CD82 (Cannon and Cresswell, 2001). D'autre part, l'absence, chez la souris, de BAP31, une protéine chaperon qui forme des complexes avec la calnexine, est associée à des réductions d'expression de CD81 et de CD9 (Zuppini et al., 2002). La calnexine et la BAP31 pourraient donc contrôler le transport des tétraspanines à la surface des cellules (Berditchevski and Odintsova, 2007).

La distribution abondante des tétraspanines dans des vésicules intracellulaires a été démontrée essentiellement par microscopie (Berditchevski and Odintsova, 1999; Berditchevski and Odintsova, 2007; Sincock et al., 1999). La tétraspanine la mieux étudiée par rapport au trafic intracellulaire est CD63, identifié comme un marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes, où elle se trouve souvent dans les membranes internes. Le motif de ciblage (GYEVM) vers les lysosomes présent dans son domaine cytoplasmique C-terminal interagit avec les complexes de protéines adaptatrices, liant alors le trafic de CD63 aux voies dépendantes de la clathrine (Rous et al., 2002). Cependant, cette interaction avec les protéines adaptatrices semble cellule-spécifique, puisque l'adressage de CD63 aux lysosomes dans des fibroblastes de souris est indépendant de ce motif, suggérant qu'une

(des) voie (s) alternative (s) existe (ent) (Rous et al., 2002). Dans ce sens, une étude récente a montré que CD63 interagit avec la synténine-1, une protéine qui contient un domaine PDZ et qui est connue pour réguler le transport intracellulaire de ses protéines partenaires (Latysheva et al., 2006).

En plus de CD63, d'autres tétraspanines, incluant CD37, CD82, CD151, Tspan-1, Tspan-3, Tspan-6, Tspan-7 et Co-029, possèdent également le motif potentiel d'internalisation (YXXØ) au niveau de leur extrémité C-terminale (Stipp et al., 2003b). Notamment, CD37, CD82 et CD151 sont dirigées vers les endosomes (Berditchevski and Odintsova, 2007). Ce motif est localisé, dans la plupart des cas, dans une région très proche du quatrième TMD, ce qui pourrait empêcher l'interaction avec les sous-unités des complexes de protéines adaptatrices (Berditchevski and Odintsova, 2007). Par contre, la suppression de ce motif dans CD151 entraîne une perte de la capacité des cellules à migrer sur la laminine, probablement due à la diminution de l'internalisation des intégrines (Liu et al., 2007).

Plusieurs tétraspanines s'accumulent dans des corps multivésiculaires qui fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer, dans le milieu extracellulaire, des vésicules de 50 à 100nm, appelées exosomes (Escola et al., 1998; Raposo et al., 1996). Les exosomes produits par de nombreux types cellulaires présentent des tétraspanines (Abache et al., 2007; Morelli et al., 2004). L'activation des cellules T Jurkat, par exemple, cause une diminution des niveaux de CD81 en surface, mais en parallèle induit la libération d'exosomes présentant de la CD81 et qui vont la transférer à la surface de cellules négatives pour cette tétraspanine (Fritzsching et al., 2002). Les exosomes pourraient alors fonctionner comme des vésicules de communication intercellulaire. L'expression de certaines tétraspanines, comme CD81, qui ne possèdent pas de motif d'internalisation dans des vésicules cellulaires, comme les corps multivésiculaires et les exosomes, pourrait s'expliquer par la présence de ce motif dans environ 10 autres membres de la famille et par leurs tendance à s'associer entre elles (Berditchevski and Odintsova, 2007).

4. La fonction des tétraspanines

Les tétraspanines sont impliquées dans divers processus biologiques comme l'adhérence, la migration ou la fusion des cellules ; dans des phénomènes de costimulation, de transduction de signal ou encore de différenciation. Leur fonction à l'échelle moléculaire reste toutefois spéculative (Boucheix and Rubinstein, 2001; Hemler, 2003; Levy and Shoham, 2005c). Différentes approches ont été utilisées pour analyser la fonction des tétraspanines, notamment l'utilisation d'anticorps anti-tétraspanines, la surexpression par transfection et leur déplétion par ARN interférence ou l'inactivation de gènes (*knockout*) chez la souris. Souvent identiques d'une tétraspanine à l'autre, ces effets concernent en particulier

l'adhérence homotypique (Masellis-Smith et al., 1990), l'inhibition de la migration cellulaire (Cajot et al., 1997; Jones et al., 1996; Lagaudriere-Gesbert et al., 1997; Miyake et al., 1991; Radford et al., 1997; Rubinstein et al., 1994; Stipp and Hemler, 2000; Yanez-Mo et al., 1998), des effets antiprolifératifs (Oren et al., 1990) ou de costimulation (Lagaudriere-Gesbert et al., 1997). L'invalidation chez la souris du gène de plusieurs tétraspanines a révélé leur rôle dans l'activation des cellules du système immunitaire (Knobeloch et al., 2000; Maecker and Levy, 1997; Miyazaki et al., 1997; Tarrant et al., 2002; Tsitsikov et al., 1997; van Spriël et al., 2004; Wright et al., 2004). Il est cependant difficile de distinguer si ces réponses physiologiques sont issues de l'action directe de la tétraspanine concernée ou des propriétés des partenaires qui lui sont associés. Pour ces raisons, le rôle individuel des tétraspanines reste assez mal connu. CD81 faisant l'objet de mon sujet de thèse, sa fonction dans différents processus est plus amplement développée.

Les tétraspanines ont également été impliquées dans différentes pathologies. Des mutations dans certaines tétraspanines ont été associées à des maladies génétiques, comme certaines formes de rétinite pigmentaire (Kohl et al., 1997) et certains cas de déficit mental lié au chromosome X (Zemni et al., 2000). Néanmoins, les mécanismes qui régulent ces maladies sont très peu connus. Par contre, il est bien décrit qu'un grand nombre de mutations dans les gènes des tétraspanines RDS/périphérine et ROM-1 est associé à des dystrophies rétiniennes. La plupart de ces mutations ponctuelles changent le domaine EC2, mais elle peuvent aussi changer d'autres régions de ces deux molécules (Kohl et al., 1997). Un chapitre décrivant l'implication des tétraspanines dans différentes pathologies d'origine infectieuse est développé plus largement par la suite.

4.1. Les ligands des tétraspanines

S'il est clairement documenté que les tétraspanines s'associent latéralement avec diverses protéines membranaires, il existe par contre peu de ligands connus pour interagir avec les tétraspanines. L'exemple le mieux caractérisé est l'interaction de la glycoprotéine E2 de l'enveloppe du VHC avec CD81. Un autre exemple de ligand est la glycoprotéine soluble spécifique de la grossesse PSG17, une protéine produite par le placenta et appartenant à la superfamille des Ig. Chez la souris, mais pas chez l'homme, PSG17 interagit spécifiquement avec CD9 et inhibe la fusion des gamètes. Le site SFQ de CD9 est nécessaire à la fixation de PSG17 (Ellerman et al., 2003; Waterhouse et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que l'IL-16 est aussi un ligand potentiel de CD9 (Qi et al., 2006). Cependant, CD9 pourrait potentialiser la fixation de l'IL-16 sur les cellules, en modulant la conformation et/ou l'activité du récepteur de l'IL-16, d'une manière analogue à l'effet qu'exerce CD9 sur la fixation de la toxine diphtérique sur le pro-HB-EGF (Iwamoto et al., 1994). Récemment, un ligand pour la tétraspanine CD63 a été identifié par le test du double

hybride. Ce ligand est le facteur soluble TIMP-1, qui fait partie de la famille des protéines inhibitrices des métalloprotéases de la matrice extracellulaire. A ce titre, TIMP-1 est donc directement impliqué dans la régulation du renouvellement des protéines de la matrice extracellulaire mais également dans la régulation de la prolifération, la survie cellulaire et la différenciation. En outre, cette étude montre que l'expression de CD63 est nécessaire à l'effet anti-apoptotique et à la polarisation cellulaire induits par la surexpression de la protéine TIMP-1 (Jung et al., 2006).

Enfin, un premier ligand membranaire de tétraspanine a également été identifié récemment. Il s'agit du récepteur DARC de chemokines, présente à la surface des cellules endothéliales et qui interagit avec CD82 (Bandyopadhyay et al., 2006). En fait, les cellules cancéreuses exprimant la CD82 se lient aux cellules endothéliales via l'interaction de CD82 avec DARC. Cette interaction entraîne une inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses, ainsi que des signaux de sénescence. De plus, la capacité de CD82 à être un suppresseur de tumeur est fortement diminuée dans les souris déficientes pour DARC, indiquant que cette protéine est essentielle dans ce mécanisme (Bandyopadhyay et al., 2006).

4.2. L'influence des tétraspanines dans les fonctions de leurs partenaires

Les tétraspanines contribuent à réguler la fonction de leurs partenaires de plusieurs façons. Tout d'abord, elles peuvent jouer un rôle dans le trafic intracellulaire ou extracellulaire de ces molécules associées. Comme expliqué précédemment, CD81 est nécessaire à l'expression de son partenaire CD19 à la surface des lymphocytes B (Maecker and Levy, 1997; Miyazaki et al., 1997; Shoham et al., 2003; Shoham et al., 2006; Tsitsikov et al., 1997). Par ailleurs, la tétraspanine CD63 s'associe à la sous-unité β de la pompe Sodium-proton ($H^+K^+ATPase$), qui est responsable de l'acidité gastrique. Cette interaction permet l'internalisation de la pompe dans les cellules pariétales de l'estomac et sa redistribution vers des vésicules intracellulaires (Duffield et al., 2003). Un autre exemple vient de la surexpression de CD82 dans les cellules épithéliales, qui induit de manière indirecte une augmentation de l'internalisation des ligands du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF), avec lequel CD82 s'associe (Odintsova et al., 2000). La tétraspanine CD9 est, quand à elle, associée aux formes précurseurs de certains ligands du récepteur de l'EGF, comme le pro-TGF- α (facteur α de croissance de tumeur), le pro-HB-EGF (facteur de croissance épidermique lié à l'héparine) et la pro-amphiréguline. L'association de CD9 augmente l'activité de ces ligands dans les phénomènes de signalisation juxtacrine (Higashiyama et al., 1995; Shi et al., 2000). CD9 s'associe également avec une métalloprotéase, ADAM10, capable de cliver certains précurseurs de facteurs de croissance associés à cette tétraspanine (Yan et al., 2002).

Dans plusieurs types cellulaires, il a été montré que les complexes entre les tétraspanines et les intégrines β_1 sont fonctionnellement importants, jouant un rôle dans la régulation de la migration et de l'adhésion cellulaire (Berditchevski, 2001; Boucheix and Rubinstein, 2001; Hemler, 2001). Par exemple, l'expression ectopique de CD9 dans une lignée de cellules B augmente la migration dépendante de l'intégrine β_1 , accompagnée d'une augmentation de l'activation des protéines tyrosine kinases (Shaw et al., 1995). Le pontage covalent de CD81 à la surface de cellules B humaines induit une adhésion dépendante de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ (Behr and Schriever, 1995). Des anticorps monoclonaux dirigés contre CD151 ou contre $\alpha_3\beta_1$ peuvent inhiber la migration des neutrophiles *in vitro* (Yauch et al., 1998), et CD151 exerce une influence majeure sur la morphogénèse dépendante de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ des fibroblastes et des cellules endothéliales (Zhang et al., 2002).

Un autre mécanisme de régulation exercé par les tétraspanines est la potentialisation des interactions de leurs partenaires moléculaires avec leurs ligands. Le premier exemple connu est celui du CD9, qui augmente non seulement l'activité juxtacrine du pro-HB-EGF (Higashiyama et al., 1995), mais rend aussi possible la fixation de la toxine diphtérique sur son récepteur, la forme membranaire du pro-HB-EGF (Iwamoto et al., 1994). Cette activité est spécifique de CD9, puisqu'elle n'est pas observée avec d'autres tétraspanines, telles que CD63, CD81, CD82, auxquelles pro-HB-EGF est probablement indirectement associé via CD9 (Nakamura et al., 2000). Un autre exemple est la modulation des fonctions des intégrines, particulièrement par CD151 qui s'associe aux intégrines $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$ et $\alpha_7\beta_1$. Les tétraspanines peuvent soit induire des changements dans la liaison des intégrines à leur ligands, soit induire des modifications au niveau du trafic des intégrines ou soit induire des modifications des voies de signalisation. Ainsi, il a été montré que les tétraspanines facilitent l'interaction des intégrines avec leur(s) ligand(s) (Feigelson et al., 2003; Lammerding et al., 2003) et stabilisent leurs conformations sous forme active (Nishiuchi et al., 2005). L'inhibition de l'expression de CD151 réduit la migration cellulaire dépendante des intégrines (Kazarov et al., 2002; Stipp and Hemler, 2000; Zhang et al., 2002) et la motilité et l'adhésion des cellules sur le substrat de ces intégrines, sans modifier leur niveau d'expression (Winterwood et al., 2006). De plus, l'association à CD151 stabilise la conformation active de l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ (Nishiuchi et al., 2005); et l'association à CD81 facilite l'adhérence des cellules leucocytaires sur VCAM-1, en augmentant l'avidité de l'interaction de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ pour ce substrat (Feigelson et al., 2003).

Enfin, les tétraspanines peuvent réguler des phénomènes de transduction de signaux intracellulaires en aval de leurs molécules partenaires. Les récepteurs couplés aux protéines G sont régulés dynamiquement par CD9 et CD81 dans les cellules humaines (Little et al., 2004). Ces tétraspanines sont également capables d'activer des voies de signalisation

intracellulaires, telles que ERK/MAPK, et sont associées à l'apoptose, via l'activation de la caspase 3 (Cai et al., 1997; Carloni et al., 2004; Kolch et al., 1993; Murayama et al., 2004). Un autre exemple est la phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K), une enzyme régulatrice de l'architecture du cytosquelette, qui interagit avec CD63, CD81 (Berditchevski et al., 1997) et CD151 (Yauch et al., 1998).

Les tétraspanines peuvent également moduler la signalisation en aval de récepteurs de facteurs de croissance. En effet, il a été montré que la surexpression de CD82 entraîne une diminution de l'activation de la signalisation induite par le récepteur de l'EGF (Odintsova et al., 2000), ainsi que celui de l'HGF (Takahashi et al., 2007). Ces protéines peuvent aussi participer à la signalisation induite par les intégrines, agissant comme des « adaptateurs » entre les intégrines et les molécules de signalisation (Berditchevski and Odintsova, 1999; Berditchevski et al., 1997; Zhang et al., 2001). Ainsi, il a été montré que la surexpression de CD151 diminue l'activation de Ras dans les fibroblastes de rat en réponse à l'adhérence médiée par les intégrines (Sawada et al., 2003), et que la sur-expression de CD82 augmente l'expression des protéines FAK et Lyn (Zhang et al., 2003a). Des anticorps anti-tétraspanines modulent la phosphorylation de la protéine FAK, la principale kinase activée dans la signalisation des intégrines (Berditchevski and Odintsova, 1999). L'activation des protéines kinase C (PKC) α et β II, qui jouent un rôle dans l'adhésion médiée par les intégrines, induit leur translocation à la membrane et leur association aux tétraspanines CD9, CD53, CD81, CD82 et CD151 (Zhang et al., 2001). Il est connu que la PKC peut également réguler l'actine (Keenan and Kelleher, 1998) et que l'actine s'associe avec CD9 et CD82 (Berditchevski and Odintsova, 1999; Delaguillaumie et al., 2004). Ces interactions pourraient alors jouer un rôle dans l'adhésion dépendante des intégrines (Hemler, 2005).

Les tétraspanines sont également impliquées dans la migration cellulaire. En effet, plusieurs approches utilisées afin d'identifier des molécules de surface contrôlant la migration de cellules tumorales en culture ont détecté des tétraspanines (Cajot et al., 1997; Feigelson et al., 2003; Jones et al., 1996; Lagaudriere-Gesbert et al., 1997; Miyake et al., 1991; Rubinstein et al., 1994; Winterwood et al., 2006; Yanez-Mo et al., 1998). Cependant, les mécanismes par lesquels ces protéines interviennent dans la migration cellulaire ne sont pas connus. Ils sont probablement à mettre en relation avec l'existence de complexes tétraspanine/intégrine. CD151 est la principale tétraspanine à interagir avec les intégrines, présentant une haute stœchiométrie d'association avec $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$ et $\alpha_7\beta_1$ (Hemler, 2005). Les tétraspanines, principalement CD151, sont capables de moduler de plusieurs façons les fonctions des intégrines (la migration, l'adhésion et la motilité cellulaire), comme expliqué précédemment.

4.3. Tétraspansines et remaniements membranaires

Plusieurs tétraspanines jouent un rôle dans les processus impliquant des phénomènes de remaniement membranaire. L'exemple le plus marquant est le rôle de CD9 dans la fusion des gamètes. En effet, l'inactivation du gène de CD9 induit une réduction majeure de la fertilité chez les souris femelles sans autre anomalie évidente (Kaji et al., 2002; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000). Cette infertilité est due à un défaut de fusion des ovocytes avec les spermatozoïdes. Les ovocytes de ces souris présentent des anomalies des microvillosités, région où le spermatozoïde fusionne (Runge et al., 2007). De plus, des anticorps anti-CD9 bloquent la fécondation *in vitro* des ovocytes normaux (Le Naour et al., 2000) et CD9 est hautement exprimée à la membrane des microvillosités des ovocytes (Runge et al., 2007). Il a été d'ailleurs montré que certains anticorps anti-CD9 induisent la formation de microvillosités dans les régions de contact entre les cellules épithéliales et endothéliales (Singethan et al., 2008). Par ailleurs, un motif SQF présent dans la région variable du domaine EC2 de CD9 est nécessaire lors de la fusion des gamètes (Zhu et al., 2002). De plus, une forme recombinante du domaine EC2 de CD9 est capable de bloquer la fusion quand elle est incubée avec les ovocytes qui expriment CD9, mais pas avec les spermatozoïdes. Ceci suggère que CD9 n'interagit pas avec un ligand présent au niveau des spermatozoïdes, mais intervient plutôt au cours de la fusion des gamètes en modulant l'activité d'une molécule partenaire sur l'ovocyte (Zhu and Evans, 2002). De plus, sur l'ovocyte, CD9 contrôle la formation de complexes contenant CD151 et l'un de ses partenaires, l'intégrine $\alpha_6\beta_1$. Ce complexe primaire semble impliqué dans la fusion avec le spermatozoïde puisqu'un anticorps anti-CD151 bloque partiellement ce mécanisme (Ziyat et al., 2006).

CD81 est également exprimée par les ovocytes et est aussi impliquée dans la fusion des gamètes. L'inactivation du gène de CD81 entraîne également une réduction de la fertilité chez les souris femelles, liée à un défaut de fusion des gamètes (Deng et al., 2000; Rubinstein et al., 2006). Des anticorps anti-CD81 ainsi que le domaine LEL peuvent partiellement inhiber le processus de fusion (Higginbottom et al., 2003; Takahashi et al., 2001). L'inactivation du gène de CD9 chez la souris ne supprime pas complètement la fertilité des femelles alors que les souris doublement déficientes en CD9 et en CD81 sont totalement stériles (Rubinstein et al., 2006). Puisque les fonctions d'une tétraspanine ne peuvent pas être totalement remplacées par celles de l'autre, CD9 et CD81 participeraient chacune à des étapes propres et probablement complémentaires dans le processus de fusion des gamètes. CD9 et/ou CD81 pourrait (aient) interagir avec une (ou des) molécule(s) responsable(s) de l'interaction entre les gamètes ou de la fusion des membranes. Cette interaction serait à l'origine de la modification acrosomique du spermatozoïde qui lui permet de fusionner (Tanigawa et al., 2008).

D'autres phénomènes de remaniements membranaires impliquent les tétraspanines : CD81 et CD9 jouent un rôle dans la fusion des myoblastes au cours de la différenciation musculaire (Tachibana and Hemler, 1999) ; CD9 participe à la différenciation des mégacaryocytes humains (Clay et al., 2001) et à la fusion pendant l'ostéoclastogenèse (Ishii et al., 2006; Takeda et al., 2003). L'engagement de CD82, en plus d'amplifier les signaux d'activation du récepteur de cellules T (TCR), induit l'adhérence, l'étalement et le développement d'extensions membranaires des lymphocytes T. Ceci par un mécanisme impliquant la polymérisation de l'actine et des Rho GTPases (Delaguillaumie et al., 2002; Lagaudriere-Gesbert et al., 1998). Par ailleurs, les tétraspanines sont également présentes dans les corps multivésiculaires et les exosomes, comme mentionné précédemment (Escola et al., 1998). L'ensemble de ces observations suggèrent que les TEM pourraient constituer un environnement particulièrement favorable aux processus impliquant des remaniements membranaires y compris la fusion.

4.4. Tétraspanines et système immunitaire

Le rôle des tétraspanines dans le système immunitaire a été essentiellement abordé par l'utilisation d'anticorps monoclonaux et par des expériences d'inactivation de gènes chez la souris (Levy and Shoham, 2005c). Les souris déficientes en CD37, une tétraspanine d'expression restreinte aux leucocytes, ont uniquement un défaut des réponses B dépendantes de l'activation des lymphocytes T (Knobeloch et al., 2000), probablement dû au rôle régulateur de CD37 dans la prolifération des cellules T (van Spriël et al., 2004). Une augmentation de la prolifération des lymphocytes T a été mise en évidence en l'absence de la tétraspanine Tssc6 (Tarrant et al., 2002). La hyperprolifération des lymphocytes T a également été observée dans les souris déficientes en CD151 (Wright et al., 2004). CD9 est également exprimée sur les lymphocytes T, ainsi que sur les cellules pré-B. Cependant, les souris dont le gène de CD9 a été invalidé ne présentent pas d'anomalies évidentes des organes lymphoïdes, du système immunitaire (Boucheix et al., 1985; Boucheix and Rubinstein, 2001; Shaw et al., 1995), de la réponse humorale, ni du développement des cellules B périphériques (Cariappa et al., 2005).

A l'origine CD81 a été identifié en tant que cible, à la surface des lymphocytes B, d'un anticorps antiprolifératif (5A6) (Oren et al., 1990). Il a pu être constaté depuis que CD81 est très largement distribué dans les tissus humains et impliqué dans un nombre considérable de réponses physiologiques (Levy et al., 1998). Son rôle le mieux caractérisé est celui dans les cellules immunitaires. En effet, différentes études de l'inactivation du gène de CD81 montrent que les souris sont normales et possèdent une maturation normale de toutes les cellules lymphoïdes (Maecker and Levy, 1997; Miyazaki et al., 1997; Tsitsikov et al., 1997). Cependant, la prolifération *in vitro* des lymphocytes T, en réponse à différents stimuli, est

augmentée en l'absence de CD81. Les souris déficientes pour CD81 présentent un défaut dans la réponse antigénique de type Th2 (Deng et al., 2002; Maecker et al., 1998) et une hyper-réactivité induite par des allergènes (Deng et al., 2000). De plus, les cellules B expriment des niveaux bas de CD19 (Maecker and Levy, 1997). Ces résultats suggèrent que CD81 n'est pas essentiel pour le développement des souris, ni pour leur système immunitaire. Il est possible que d'autres tétraspanines soient recrutées pour compenser l'absence de l'expression de CD81. Néanmoins, le bas niveau d'expression de CD19 et les problèmes dans les réponse immunitaires humorales suggèrent que les fonctions de CD81 ne puissent pas être complètement substituée par d'autres protéines (Levy et al., 1998).

A la surface des lymphocytes B, CD81 forme un complexe d'activation lymphocytaire par son interaction directe avec CD19, une molécule de signalisation. Ce complexe contient également les protéines CD21, un récepteur du complément, et Leu 13, un antigène inductible par l'IFN. La fixation de l'antigène sur le récepteur des lymphocytes B (BCR) entraîne sa co-ligation au complexe CD19/CD21/CD81/Leu13, via la fixation du complément (présent sur l'antigène) sur la protéine CD21 (Dempsey and Fearon, 1996). Cette co-ligation a pour conséquence d'augmenter la signalisation induite par l'activation du récepteur, en diminuant le seuil de réponse à l'antigène (Tedder et al., 1994). L'engagement du BCR avec le complexe CD19/CD21/CD81/Leu13 est accompagné d'une augmentation de l'incorporation de palmitates par CD81, qui est nécessaire à la relocalisation du BCR dans les microdomaines résistants aux détergents (Cherukuri et al., 2004a). Les complexes BCR-CD81/CD19 associés à ces microdomaines activent des voies de signalisation intracellulaire, ceci étant caractérisé par la phosphorylation de résidus tyrosine de nombreuses protéines (Cherukuri et al., 2004b). L'engagement du BCR au sein du complexe CD19/CD21/CD81/Leu13 par la glycoprotéine E2 du VHC pourrait le super activer, causant la prolifération de cellules B et même le lymphome non-Hodgkin de cellules B chez les individus infectés (Levy et al., 1998; Rosa et al., 2005). Par ailleurs, dans les lymphocytes B, CD81 est également retrouvé en association avec des molécules de MHC II (Schick and Levy, 1993). Les corps multivésiculaires enrichis en MHC II présentent non seulement CD81, mais également d'autres tétraspanines, telles que CD37, CD53, CD63 et CD82 (Kropshofer et al., 2002).

De plus, CD81, comme plusieurs tétraspanines d'ailleurs, est une molécule co-stimulatrice à la surface de cellules T, jouant un rôle dans l'activation des lymphocytes T (Lagaudriere-Gesbert et al., 1997). Chez la souris, CD81 est exprimée dans toutes les cellules B et cellules T activées (Maecker et al., 2000). Par ailleurs, comme pour les cellules B, le co-engagement de CD81 avec le complexe antigène-récepteur induit l'activation des cellules T (Witherden et al., 2000). L'association de CD81, à la fois avec des molécules sur les lymphocytes T, telles que CD4 et CD8, et avec un sous ensemble de molécules MHC II

sur les cellules présentatrices d'antigènes, peut également affecter la prolifération des lymphocytes T et leur polarisation (Kropshofer et al., 2002; Levy et al., 1998). Enfin, la relocalisation de CD81 dans les régions de synapse immunologique, entre les cellules T et B, et entre les cellules T et les cellules présentatrices d'antigènes, suppose un rôle important dans la collaboration entre ces cellules (Mittelbrunn et al., 2002).

4.6. Tétraspanines et autres systèmes

Les tétraspanines CD9, CD151 et CD63 sont fortement exprimées sur les plaquettes (Boucheix et al., 1983; Fitter et al., 1995; Hotta et al., 1988; Rubinstein et al., 1993). Plusieurs études ont rapporté l'association entre CD9 et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface des plaquettes et dans les pseudopodes (Brisson et al., 1997; Indig et al., 1997; Slupsky et al., 1989). L'étude des souris déficientes pour CD151 a mis en évidence son rôle dans l'agrégation plaquettaire et la rétractation du caillot, activités induites suite à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Lau et al., 2004). Par ailleurs, l'activation des plaquettes entraîne la relocalisation de CD63 à la surface où elle s'associe avec CD9 et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Hamamoto et al., 1994; Israels et al., 2001). CD63 pourrait participer à la signalisation induite par l'activation de cette intégrine (Israels and McMillan-Ward, 2005).

Par ailleurs, plusieurs tétraspanines sont exprimées dans le système nerveux (Banerjee et al., 1997; Bronstein et al., 2000; Stipp and Hemler, 2000). CD9, Tspan-2, Tspan-3 sont exprimées sur les gaines de myélines (Bronstein et al., 2000) et Tspan-5 est exprimée dans les structures corticales du cerveau (Garcia-Frigola et al., 2000). Leur importance physiologique dans le cerveau est suggérée par les effets des anticorps anti-CD81, anti-CD9 et anti-CD151 sur la croissance des neurites (Schmidt et al., 1996; Stipp and Hemler, 2000). L'expression de CD81 est fortement augmentée sur les astrocytes et les cellules de la microglie après lésion de la moelle épinière chez le rat (Dijkstra et al., 2000). De plus, les souris déficientes pour CD81 présentent une augmentation de la taille du cerveau accompagnée d'une augmentation du nombre d'astrocytes et de cellules de la microglie (Geisert et al., 2002). La prolifération de ces cellules pourrait être régulée par l'engagement de CD81 au niveau des contacts entre les cellules (Kelic et al., 2001).

4.6. Tétraspanines et cancer

Les tétraspanines sont aussi impliquées dans différentes pathologies. De nombreuses études cliniques sur le cancer montrent un lien entre le niveau d'expression de certaines tétraspanines et la formation des métastases tumorales (Boucheix and Rubinstein, 2001), le plus souvent en tant que suppresseurs (Dong et al., 1995; Ikeyama et al., 1993; Radford et al., 1995), mais parfois aussi en tant que promoteurs (Claas et al., 1998). En effet, dans les cancers du sein, du poumon, du colon, de la prostate et du pancréas, un

niveau d'expression élevé de CD9 ou de CD82 sur les cellules tumorales est associé à un pronostic favorable. A l'inverse, une diminution de leur expression est souvent corrélée avec l'apparition de métastases dans ces cancers (Adachi et al., 1998; Boucheix and Rubinstein, 2001; Huang et al., 1998; Maurer et al., 1999; Miyake et al., 1999). Dans les cancers du poumon et du sein, la réduction simultanée de l'expression de CD9 et de CD82 présente un plus grand potentiel métastatique et un taux de survie plus bas que lorsque l'expression de seulement une des deux tétraspanines est réduite (Adachi et al., 1998; Huang et al., 1998). CD63 est également fortement exprimée dans les stades initiaux des mélanomes, tandis que son expression est réprimée dans les stades avancés de la maladie (Hotta et al., 1988). Il y a cependant quelques exceptions. La surexpression de CD151 dans les cancers du poumon, du colon et de la prostate est corrélée avec un mauvais pronostic (Ang et al., 2004; Hashida et al., 2003; Tokuhara et al., 2001). De même, l'induction de l'expression de Co-029 est observée, chez le rat, dans des lignées cellulaires de carcinome de colon et de pancréas, qui présentent un plus grand potentiel métastatique (Claas et al., 1998). En résumé, les expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que CD82 et CD9 sont des suppresseurs de métastases tandis que CD151 et Co-029 augmentent le potentiel métastatique (Claas et al., 1998; Gesierich et al., 2006; Takeda et al., 2007).

Les mécanismes qui entraînent le développement et la progression des cancers font intervenir la migration cellulaire, avec notamment un rôle prépondérant des intégrines. Cependant, en tenant compte de la multitude de molécules associées aux tétraspanines, la façon dont elles contrôlent la progression tumorale pourrait ne pas être limitée à leur association avec les intégrines. Dans ce sens, les facteurs de croissance possèdent également un rôle important dans la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses. Puisque les tétraspanines modulent ces différents mécanismes, elles pourraient ainsi jouer un rôle prépondérant dans le cancer.

5. Les tétraspanines et pathologies d'origine infectieuse

Les tétraspanines sont impliquées dans l'action de la toxine diphtérique, comme décrit précédemment, mais aussi dans l'infection par différents pathogènes. En plus de la participation de CD81 dans l'entrée du VHC, d'autres tétraspanines jouent des rôles dans les infections par d'autres virus, tels que le VIH et le virus de la leucémie humaine de cellules T (HTLV). D'autre part, CD81 participe au cycle du parasite *Plasmodium*, responsable du paludisme. Enfin, une étude a montré un lien entre CD9 et PrP dans le cerveau de souris infectées avec l'agent de l'encéphalopathie spongiforme transmissible. Dans cette étude, des analyses par immunohistochimie ont démontré une stimulation de l'expression de CD9, spécialement dans les astrocytes, chez l'homme et dans le modèle de la souris (Doh-ura et al., 2000).

Des études reposant notamment sur l'utilisation d'anticorps anti-tétraspanines ont permis de mettre en évidence le rôle de celles-ci au cours d'infections par des virus. CD9, par exemple, a été impliquée dans la susceptibilité à l'infection par le virus de l'immunodéficience féline (VIF) (Willett et al., 1997). En effet, des anticorps anti-CD9 inhibent la production de virions du VIF (Hosie et al., 1993; Willett et al., 1994), par un mécanisme agissant après l'entrée du virus (de Parseval et al., 1997; Willett et al., 1997). Ces anticorps inhibent également l'infection par le virus de la maladie de Carré (CDV, de l'anglais *canine distemper virus*), un morbillivirus qui infecte les canidés (Loffler et al., 1997). Dans ce cas, l'inhibition se fait au niveau de la fusion cellule-cellule, induite normalement par ce virus, bloquant la sécrétion de particules virales (Schmid et al., 2000). Plus spécifiquement, il a été montré récemment que les protéines virales restent distantes du contact entre les cellules, ce qui permet d'expliquer l'absence de fusion et de diffusion virale à travers les cellules (Singethan et al., 2008).

Par ailleurs, les protéines d'enveloppe et la protéine de matrice du HTLV-1 sont associées à CD82 (Mazurov et al., 2006; Pique et al., 2000). Des anticorps anti-CD81, anti-CD82 et la surexpression de CD82 avec les glycoprotéines d'enveloppe du HTLV-1 inhibent la formation de syncytium induite par ce virus. Ceci résulte en une inhibition de la transmission du virus de cellule à cellule (Fukudome et al., 1992; Imai et al., 1992; Imai and Yoshie, 1993; Pique et al., 2000). D'autre part, la protéine de matrice de ce virus colocalise et co-immunoprécipite avec CD82, suggérant une association avec les TEM, qui pourraient être impliquée dans la transmission des virions (Mazurov et al., 2006). Récemment, il a été montré que le domaine intracellulaire, entre les troisième et quatrième TMD, et la palmitoylation des cystéines juxtamembranaires sont importants pour l'interaction de CD82 avec la protéine de matrice de HTLV-1 (Mazurov et al., 2007).

5.1. Tétraspanines et VIH

Des études ont également établi un lien entre le VIH-1 et les tétraspanines. Le cycle de ce virus est représenté dans la **Figure 23**.

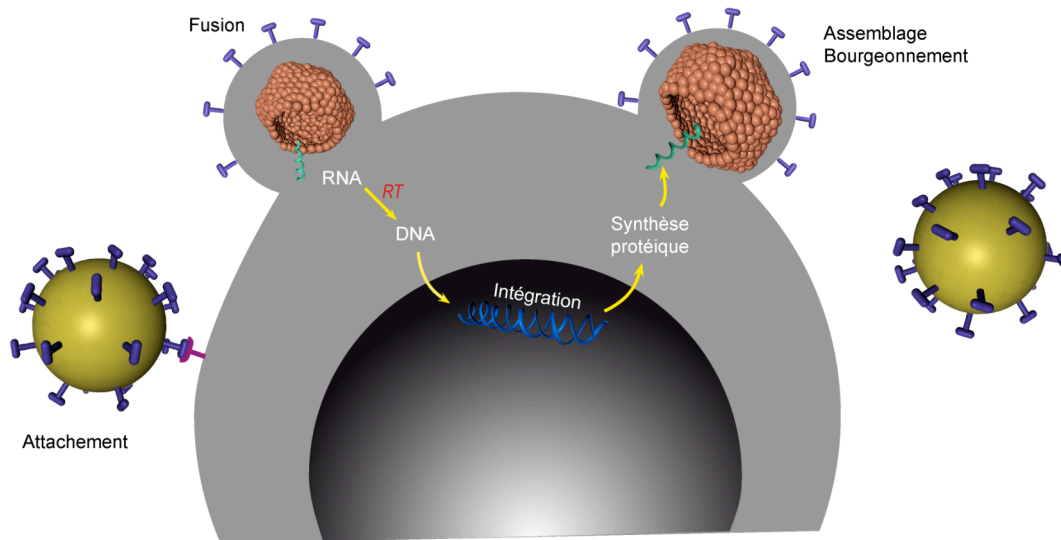


Figure 23. Représentation schématique du cycle viral du VIH.

CD63 est une des protéines cellulaires incorporées dans les virions du VIH (Chertova et al., 2006; Meerloo et al., 1993; Pelchen-Matthews et al., 2003). Cependant, les virions possédant moins de CD63 sont plus infectieux. De plus, les tétraspanines CD63, CD9, CD81 et CD82 incorporées sur les virions ont le potentiel d'atténuer l'infection du VIH de manière souche-spécifique et à une étape post-attachement (Sato et al., 2008) (**Figure 24**).

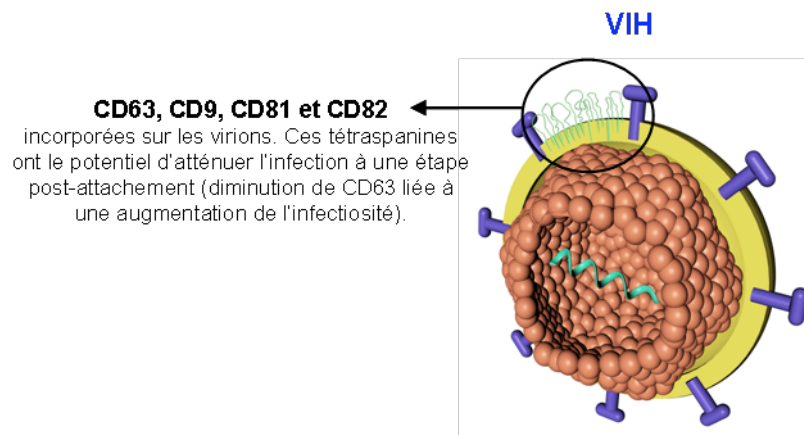


Figure 24. Représentation schématique de la particule virale du VIH.

Il a été montré que, dans les macrophages, des anticorps anti-CD63 inhibent l'infection par le VIH, dans une étape après la fusion du virus (von Lindern et al., 2003). Dans ces cellules, à l'inverse des autres types cellulaires, le VIH ne semble pas bourgeonner à la membrane plasmique. En effet, les virions de VIH s'accumulent et probablement s'assemblent dans des endosomes tardifs, enrichis en CD63, avant de fusionner à la membrane plasmique (Deneka et al., 2007; Pelchen-Matthews et al., 2003). Plus spécifiquement, CD63 est recruté dans des compartiments intracellulaires riches en tétraspanines CD81, CD9 et CD53 pendant l'assemblage viral (**Figure 25**). Dans les cellules

qui n'expriment pas de CD63, le virus s'assemble dans le même compartiment intracellulaire riche en CD81, CD9 et CD53 (Ruiz-Mateos et al., 2008). Ce compartiment cellulaire est différent des lysosomes et des endosomes précoces et tardifs (Deneka et al., 2007). De plus, l'infection de macrophages par le VIH est inhibé par des protéines recombinantes exprimant les domaines EC2 des tétraspanines CD9, CD63, CD81 et CD151, suggérant que les TEM participeraient à l'infection plutôt que des tétraspanines individuelles (Ho et al., 2006) (**Figure 25**). Toutefois, très récemment il a été montré que le traitement de macrophages avec des ARN interférents dirigés contre CD63 ne modifie ni l'infection, ni la production de nouvelles particules virales, ni l'infectiosité des virus produits dans ces cellules. La redondance et le chevauchement fonctionnel des tétraspanines pourraient jouer un rôle dans l'assemblage du VIH dans les macrophages.

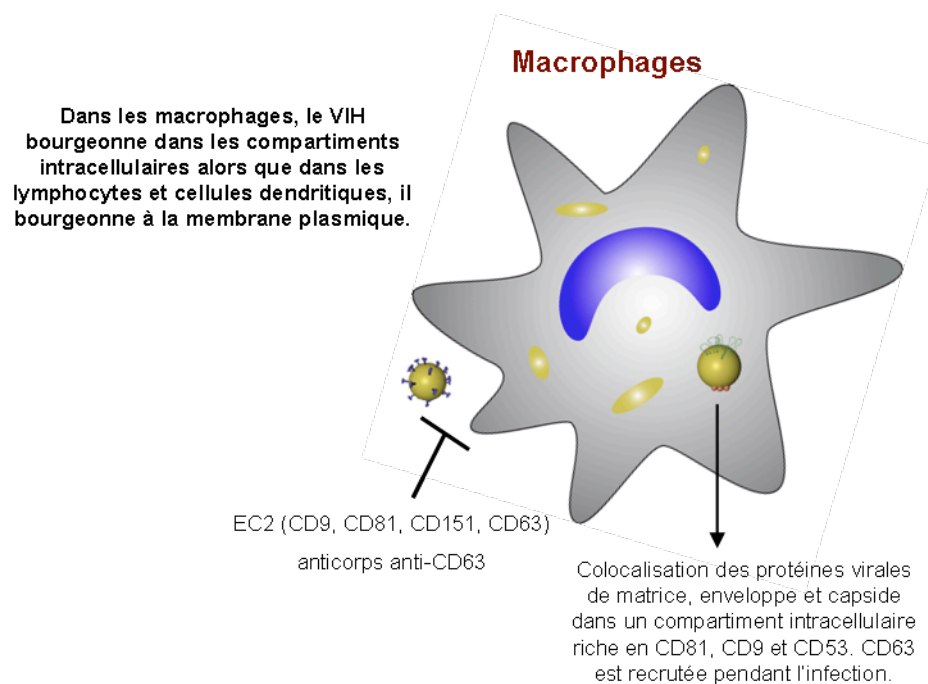


Figure 25. Résumé de la participation des tétraspanines dans l'infection des macrophages par le VIH.

Les cellules dendritiques sont capables de capturer le VIH et de le transférer aux cellules T CD4⁺ (**Figure 26**). De manière équivalente à ce qui a été montré pour les macrophages, après l'internalisation par les cellules dendritiques, le virus se localise dans des compartiments légèrement acides (pH 6,2) riches en tétraspanines, telles que CD81, CD82, CD9 et partiellement CD63 (Garcia et al., 2008; Garcia et al., 2005). Lors du contact avec les cellules T CD4⁺ non infectées, le virus présent dans les cellules dendritiques colocalise avec CD81 au site de contact entre les cellules, appelé synapse virologique (**Figure 26**). En effet, le virus stimule la redistribution de CD81 et CD9 vers les régions de contact, suggérant que le VIH serait capable d'exploiter la voie responsable de la livraison des composants qui participent à la formation de la synapse immunologique et de l'activation

des cellules T, pour faciliter son transfert aux cellules T CD4⁺ (Garcia et al., 2008; Garcia et al., 2005). Dans ce sens, il a été montré récemment que dans des cellules HeLa transfectées avec la séquence complète du VIH, l'anti-CD9 C9BB induit l'aggrégation de différentes tétraspanines (CD9, CD81, CD82 et CD63) et de protéines virales (capside et enveloppe) aux sites de contact entre les cellules. Ce processus inhibe la sécrétion de particules virales, probablement parce qu'il restreint le bourgeonnement aux sites de contact intercellulaires (Khurana et al., 2007).

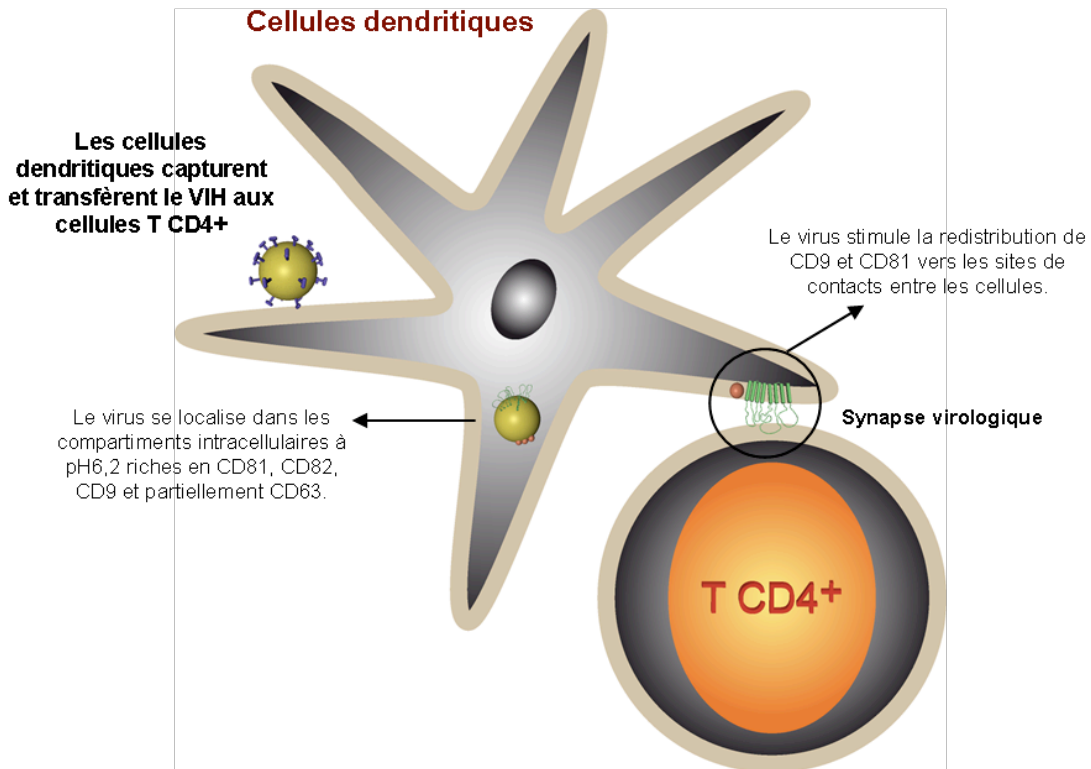


Figure 26. Résumé de la participation des tétraspanines dans l'infection de cellules dendritiques par le VIH.

Dans les cellules T, la protéine de capsid du VIH colocalise avec CD9, CD81, CD82 et CD63 à la surface de la membrane plasmique (Booth et al., 2006; Nydegger et al., 2006). Ce microdomaine, dépendant d'actine, serait utilisé par le VIH pour permettre l'assemblage, le bourgeonnement et le transfert de nouveaux virus d'un lymphocyte à un autre (Jolly and Sattentau, 2007) (**Figure 27**). De manière similaire à l'infection des macrophages par le VIH, décrite précédemment, dans les cellules T infectées, CD63 relocalise vers des régions riches en CD81, où ces deux marqueurs colocalisent avec les protéines de capsid et de l'enveloppe virale (Jolly and Sattentau, 2007).

Par ailleurs, il a été montré que la distribution de CD81 à la membrane plasmique varie selon la présence du virus (Gordon-Alonso et al., 2006). Ainsi, de manière similaire à ce qui a été montré sur les synapses virologiques des cellules dendritiques, Gordon-Alonso

et collaborateurs ont montré que lorsque des cellules T naïves sont incubées avec des cellules T exprimant la protéine d'enveloppe du VIH, CD81 et CD9 s'accumulent aux régions de contact intercellulaire, où se passe la fusion. De manière intéressante, à l'inverse de ce qui se passe avec le CDV, le FIV et le HTLV, des anticorps anti-CD81 et anti-CD9 augmentent la formation de syncytium et la production virale (**Figure 27**). De même, des ARN interférents contre ces tétraspanines augmentent la formation de syncytium entre les cellules T naïves et celles qui expriment la protéine de l'enveloppe virale, alors que la surexpression de CD81 et de CD9 induit une diminution du nombre de syncytia (Gordon-Alonso et al., 2006) (**Figure 27**). L'association entre CD81 et CD4 (Imai et al., 1995; Imai and Yoshie, 1993) pourrait expliquer ces résultats. En effet, dans les conditions qui diminuent l'expression de CD81, un plus grand nombre de molécules de CD4 seraient libres pour s'associer aux protéines virales qui induisent la fusion membranaire (Gordon-Alonso et al., 2006). De plus, CD81 associé à CD4 participe à des phénomènes de co-stimulation des cellules T, qui augmentent la transcription et la production virale du VIH (Tardif and Tremblay, 2005).

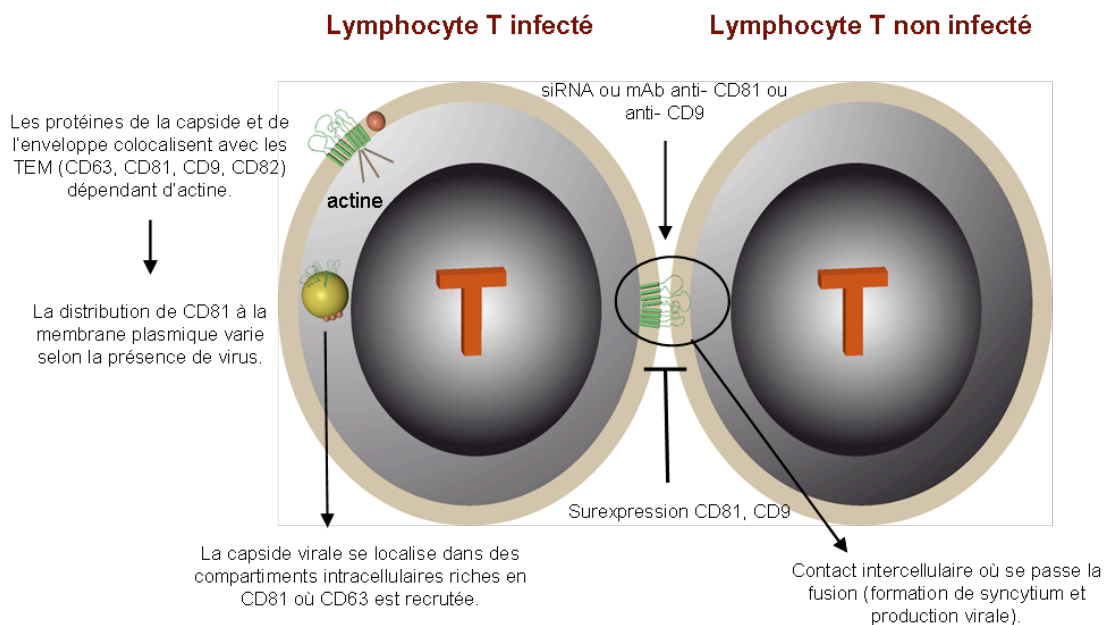


Figure 27. Résumé de la participation des tétraspanines dans l'infection de lymphocytes T par le VIH.

5.2. Tétraspanines et infections bactériennes

Comme décrit précédemment, CD9 pourrait aussi participer à la pathogénie de la diphtérie. CD9 est associée au précurseur du facteur de croissance HB-EGF, le pro-HB-EGF, et HB-EGF est le récepteur de la toxine diphtérique sous ses formes soluble ou

membranaire (Hooper and Eidels, 1995; Mitamura et al., 1995). L'expression de CD9 à la surface de cellules exprimant le pro-HB-EGF entraîne une augmentation du nombre de sites d'interaction avec la toxine diphtérique, alors que le nombre de molécules HB-EGF reste constant et l'affinité n'est pas modifiée (Iwamoto et al., 1994). L'interaction de la toxine avec le précurseur membranaire lui permet d'être internalisée par la cellule et d'exercer ainsi son effet toxique (Naglich et al., 1992). A l'inverse, la forme soluble d'HB-EGF piège la toxine, la rendant inactive (Hooper and Eidels, 1995), ayant pour conséquence l'inhibition de l'activité de l'HB-EGF en tant que facteur de croissance (Mitamura et al., 1995). Il est donc possible que CD9 modifie la conformation du pro-HB-EGF, en démasquant de nouveaux sites de fixation pour la toxine, ou en concentrant ce récepteur au sein des TEM, permettant ainsi des interactions de forte avidité avec la toxine diphtérique.

D'autre part, il a été montré que CD63 se localise dans la membrane des bactéries *Chlamydia Trachomatis* (Beatty, 2006). Ces bactéries sont des parasites intracellulaires obligatoires qui se multiplient dans des organites membranaires, appelés inclusions. Cette étude a montré que CD63 est présente dans les inclusions, en association avec les membranes bactériennes. De plus, des anticorps anti-CD63 induisent une diminution de la taille des inclusions et une réduction de la descendance infectieuse des *Chlamydia* (Beatty, 2006). Ce travail suggère que CD63 joue un rôle dans la biogenèse et la maturation des inclusions bactériennes.

5.3. Tétraspanines et Plasmodium

Le rôle de CD81 a également été mis en évidence dans l'infection par l'agent responsable du paludisme, les parasites du genre *Plasmodium*. Le paludisme est la maladie parasitaire la plus fréquente au monde ; environ 40% de la population mondiale est exposée au parasite et l'OMS estime qu'il existe de 350 à 500 millions de cas par an (infections nouvelles ou ré-infections), dont presque 80% en Afrique subsaharienne (Greenwood et al., 2005). Cette maladie tue chaque année entre 1,5 et 2,7 millions de personnes (OMS, World Malaria Report 2005). Chez l'hôte vertébré, le cycle de *Plasmodium* passe par deux stades invasifs successifs, les stades sporozoïte et mérozoïte, qui infectent respectivement les hépatocytes et les érythrocytes (**Figures 28 et 29**). Les sporozoïtes, transmis à l'hôte lors d'une piqûre par un moustique femelle du genre *Anopheles*, passent dans la circulation sanguine et sont rapidement séquestrés au niveau du foie en quelques minutes (**Figure 28**). Deux protéines parasitaires de surface, la protéine circumsporozoïte (CSP) et la protéine anonyme associée à la thrombospondine (TRAP) interagissent avec les GAG des capillaires sinusoides hépatiques (Pradel et al., 2002). Les sporozoïtes traversent ensuite l'espace de Disse et pénètrent activement dans les hépatocytes, par invagination de la membrane plasmique aboutissant à la formation d'une vacuole parasitophore (**Figure 29**).

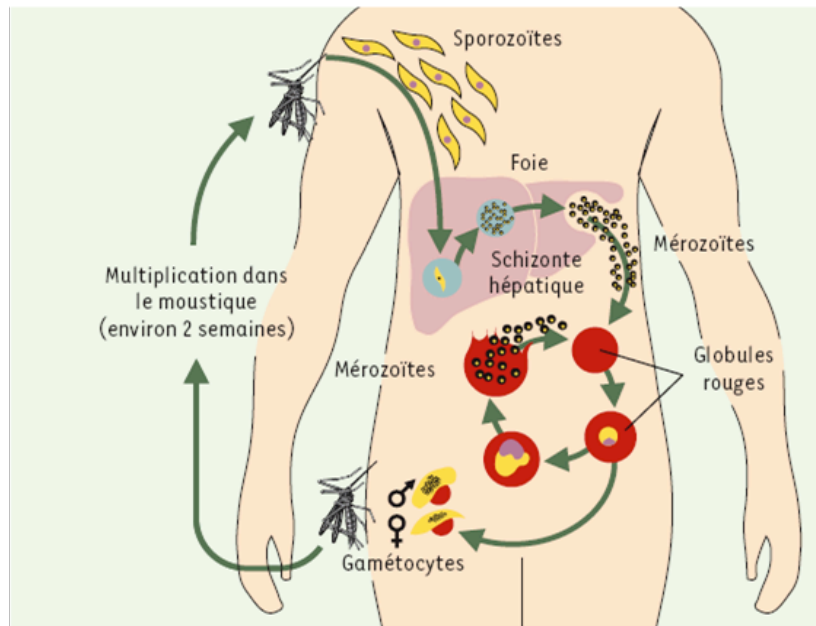


Figure 28. Le cycle de vie de *Plasmodium falciparum*.

Lors de la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles* contaminé, des sporozoïtes sont injectés dans la circulation sanguine de l'hôte. Ils gagnent le foie et infectent les hépatocytes, où ils se différencient en schizontes hépatiques. Après de nombreuses divisions nucléaires, les schizontes matures libèrent dans la circulation sanguine des mérozoïtes, qui infectent les globules rouges, où chacun se multiplie pour libérer de nouveaux mérozoïtes, qui à leur tour infectent des globules rouges. Ce cycle de multiplication érythrocytaire est responsable de la symptomatologie. Certains mérozoïtes se différencient en formes sexuées, les gamétocytes, qui peuvent être ingérés par un moustique. Dans le moustique, un cycle de multiplication sexuée aboutit à la formation de sporozoïtes, qui peuvent être transmis à un nouvel hôte à l'occasion d'une piqûre (d'après Silvie *et al.*, *Médecine/Sciences* 2003).

Les sporozoïtes peuvent également pénétrer dans les hépatocytes par effraction membranaire sans formation de vacuole, et migrer ainsi à travers plusieurs cellules avant de finalement en infecter une par formation d'une vacuole parasitophore (Mota *et al.*, 2001) (**Figure 29**). Les sporozoïtes de différentes espèces de *Plasmodium* sont capables de migrer *in vitro* à travers différents types cellulaires issus de différentes espèces (Mota *et al.*, 2001). Ceci pourrait s'expliquer par la nécessité du parasite à traverser différents tissus de l'hôte, à savoir la peau, ensuite les capillaires sinusoides du foie, avant d'atteindre les hépatocytes (Baldacci and Menard, 2004; Frevert, 2004). Au sein de la vacuole parasitophore les sporozoïtes se différencient en schizontes hépatiques, qui au bout de 2 à 7 jours selon l'espèce, libèrent des milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine (**Figure 28**). Ces mérozoïtes infectent les globules rouges, également par formation d'une vacuole, et certains se différencient en gamétocytes, ce qui permet la poursuite du cycle parasitaire lorsqu'ils sont ingérés par un moustique (**Figure 28**). La phase de multiplication des parasites dans les globules rouges est responsable des symptômes de la maladie.

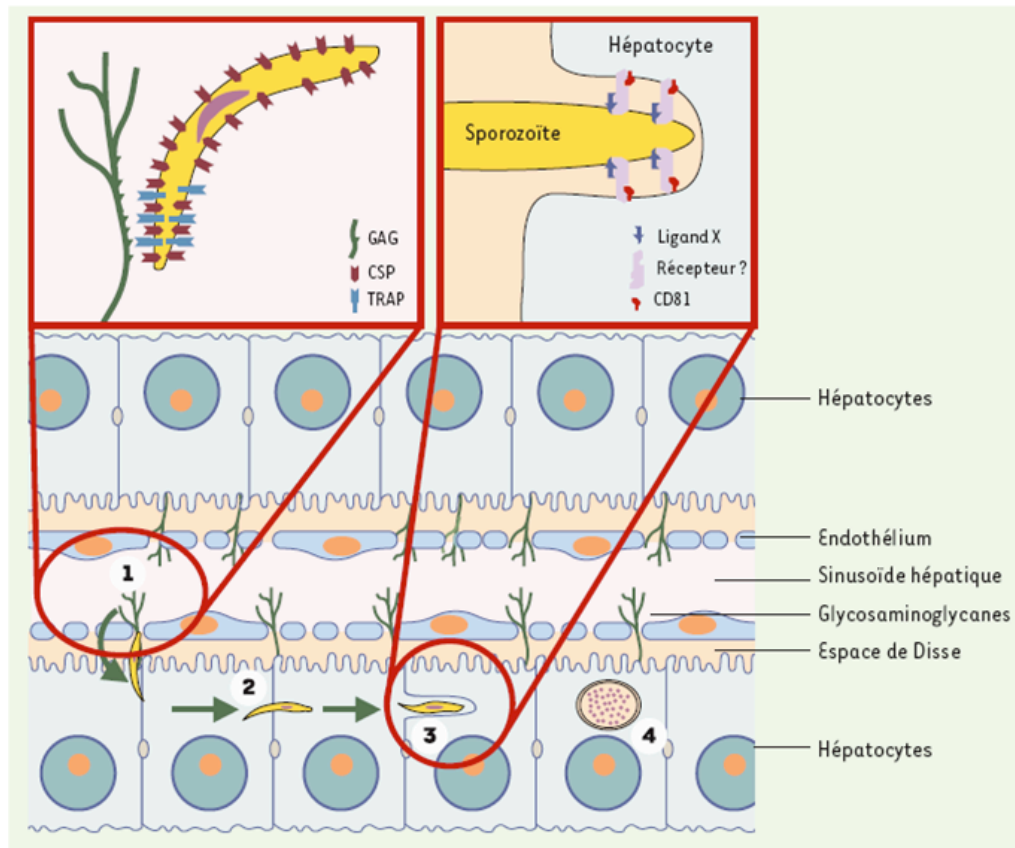


Figure 29. Le processus d'infection des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium*.

Les sporozoïtes sont séquestrés dans le foie grâce à l'interaction de protéines de surface du parasite avec les glycosaminoglycane (GAG) proéminents dans les sinusioïdes hépatiques (1). Après passage dans l'espace de Disse, qui sépare l'endothélium des capillaires sinusioïdes des hépatocytes sous-jacents, les sporozoïtes traversent plusieurs cellules par effraction membranaire (2), avant de finalement infecter un hépatocyte par formation d'une vacuole (3). Ce dernier processus est dépendant de l'expression de la tétraspanine CD81 à la surface de l'hépatocyte. Au sein de la vacuole parasitophore, les sporozoïtes se différencient en schizontes hépatiques (4) (d'après Silvie *et al.*, *Médecine/Sciences* 2003).

Jusqu'à présent, la seule molécule connue des hépatocytes qui joue un rôle dans l'infection par plusieurs espèces de *Plasmodium* est la tétraspanine CD81 (**Figure 29**). En 2003, Silvie et collaborateurs ont montré que la présence de CD81 à la surface des hépatocytes est nécessaire à l'infection par le *Plasmodium falciparum*, chez l'homme, et par le *Plasmodium yoelii*, chez la souris. En effet, les hépatocytes murins déficients en CD81 ne sont plus infectables par le *P. yoelii*, tant *in vivo* qu'*in vitro*, alors qu'aucun effet n'a été observé sur les hépatocytes déficients en CD9. L'inoculation de souris déficientes en CD81 avec des mérozoïtes a résulté en une infection sanguine, suggérant que le blocage se fait avant la phase érythrocytaire (Silvie *et al.*, 2003). De plus, des anticorps anti-CD81 humain et murin, ou la réduction de leur expression par ARN interférence, inhibent le développement *in vitro* des deux espèces du parasite (Silvie *et al.*, 2006a; Silvie *et al.*, 2006b; Silvie *et al.*, 2003). Cet effet a été observé uniquement quand l'anticorps est ajouté avant ou pendant

l'infection (Silvie et al., 2003). De plus, la palmitoylation de CD81 n'est pas indispensable pour l'invasion des hépatocytes par *P. yoelii* (Silvie et al., 2006a).

CD81 ne semble pas participer à la spécificité d'espèce du parasite. En effet, *P. falciparum* n'infecte pas des hépatocytes primaires issus de souris transgéniques déficientes pour la CD81 murine endogène, mais exprimant CD81 humaine. Par contre, l'expression de CD81 humaine restaure l'infection des hépatocytes murins par *P. yoelii* *in vivo* et *in vitro*. Ce parasite n'est cependant pas responsable du paludisme chez l'homme, dû à des barrières d'espèce en dehors du foie (Silvie et al., 2006b). Un autre parasite de rongeur, *Plasmodium berghei* est capable d'envahir les hépatocytes par des mécanismes dépendants ou non de CD81, selon la lignée de souris ou le type cellulaire analysé (Silvie et al., 2007). De manière similaire à *P. yoelii*, la CD81 humaine est capable de restaurer l'infection de *P. berghei* sur les cellules murines Hepa1-6 déficientes en CD81 murine (Silvie et al., 2007).

Plus spécifiquement, CD81 présente dans les microdomaines à tétraspanines est impliquée dans l'infection par le parasite (Silvie et al., 2006a). Cela a été montré par l'utilisation de l'anticorps anti-CD81 MT81w, qui reconnaît cette molécule uniquement lorsqu'elle est associée à d'autres molécules du *tetraspanin web*, à l'inverse, l'anticorps MT81, qui reconnaît la population globale du CD81 exprimée dans les cellules (**Figure 20**). L'anticorps MT81w inhibe l'invasion de cellules Hepa1-6 et d'hépatocytes primaires de souris par *P. yoelii* de manière dose-dépendante, bien que le blocage de l'infection par cet anticorps ne soit pas aussi efficace que celui provoqué par le MT81. Le traitement des cellules Hepa1-6 avec de la M β CB, avant l'inoculation des sporozoïtes, induit une inhibition du nombre de cellules infectées par *P. falciparum* et *P. yoelii*. De plus, après le traitement avec la M β CB, l'inhibition observée dans les cellules murines est de la même magnitude que la réduction de la reconnaissance de CD81 par l'anticorps MT81w. L'inhibition est complètement réversée par le réapprovisionnement des cellules en cholestérol avant l'inoculation ; et l'ajout de cholestérol sans traitement préalable avec la M β CB augmente l'infection, ainsi que l'efficacité de blocage de MT81w (Silvie et al., 2006a). Enfin, la M β CB inhibe uniquement l'infection par le *P. berghei* dépendante de CD81 (Silvie et al., 2006a; Silvie et al., 2007). L'ensemble de ces résultats montrent un rôle de CD81 associée aux TEM dans l'infection par le *Plasmodium* (Silvie et al., 2006a).

Récemment, une étude a permis d'identifier les résidus de CD81 critiques pour l'infection des cellules hôtes par les sporozoïtes de *P. yoelii* (Yalaoui et al., 2008). En effet, des protéines chimériques entre CD81 et CD9, qui ne supporte pas l'infection, ont permis de montrer l'importance de la LEL de CD81 pour l'infection. Les auteurs ont identifié 21 résidus, compris dans la région entre les hélices A et B et dans l'hélice B de la LEL, suffisants pour permettre l'infection. De plus, un résidu en position 137 (D137) joue un rôle clé, puisque sa mutation avec les résidus adjacents abolit complètement la capacité de CD81 à supporter

l'infection par le parasite. Bien que l'hélice C de la LEL ne soit pas essentielle, elle contribue à la fonction de CD81 pendant l'infection. De plus, des mutants de la région localisée entre les hélices A et B sont capables d'interagir normalement avec les partenaires de CD81, EWI-2 et EWI-F, suggérant que leur incapacité à permettre l'infection par le *P. yoelii* n'est pas liée à une perte d'interaction avec l'un de ces partenaires. Cette étude montre également que l'hélice D, en général critique pour les fonctions spécifiques des tétraspanines (Hasuwa et al., 2001; Kazarov et al., 2002; Zhu et al., 2002), ne joue pas un rôle direct dans l'entrée du *Plasmodium*. Ceci est en accord avec le fait que CD81 humaine et murine soient toutes les deux capables de permettre l'infection, bien que l'hélice D soit la région la plus divergente entre ces deux molécules, avec 59% de conservation et 66% de similarité (Yalaoui et al., 2008).

Toutefois, aucune interaction directe entre CD81 et le parasite n'a été mise en évidence (Silvie et al., 2003), suggérant que cette molécule ne serait pas un récepteur. CD81 aurait plutôt un rôle indirect dans l'infection. Bien que le mécanisme exact reste à déterminer, CD81 pourrait être impliqué directement ou indirectement dans la formation de la vacuole parasitophore qui est nécessaire à la différenciation du parasite (Silvie et al., 2007; Silvie et al., 2006b; Silvie et al., 2003).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Comme nous l'avons vu dans la partie III, les mécanismes d'entrée du VHC dans ses cellules cibles ne sont pas encore complètement établis. Plusieurs molécules participent à cette étape du cycle, mais leur rôles spécifiques ne sont pas clairement définis. De plus, certaines lignées cellulaires humaines exprimant les facteurs, LDL-R, GAG, SR-BI, CD81 et CLDN-1, demeurent résistantes à l'infection par le VHC. Ceci suggère qu'un ou plusieurs facteurs de l'hôte restent à identifier. Nous nous sommes concentrés sur la tétraspanine CD81. Les protéines de cette famille ont la particularité d'interagir entre elles et avec d'autres protéines, appelées partenaires, pour former un réseau à la surface des cellules, appelé *tetraspanin web* ou microdomaine enrichi en tétraspanines.

Dans la première partie de ma thèse, nous avons étudié le rôle d'un partenaire de CD81, EWI-2wint, dans l'infection par le VHC. Ces résultats ont fait l'objet de la publication suivante, disponible dans la partie I des résultats :

Rocha-Perugini V., Montpellier C., Delgrange D., Wychowski C., Helle F., Pillez A., Drobecq H., Le Naour F., Charrin S., Levy S., Rubinstein E., Dubuisson J. and Cocquerel L. (2008). The CD81 partner EWI-2wint inhibits Hepatitis C Virus entry. PLoS ONE 3(4), e1866.

Comme nous l'avons vu dans la partie IV.5.3, CD81, et plus spécifiquement CD81 associée au *tetraspanin web*, joue un rôle dans l'étape hépatique de l'infection des parasites *Plasmodium*. Comme pour le VHC, l'attachement de ces parasites aux hépatocytes se fait par l'association aux GAG et le cholestérol membranaire joue un rôle important dans l'infection. Les similarités entre les mécanismes d'entrée du VHC et d'infection hépatique des sporozoïtes de *Plasmodium* nous ont amené à analyser, dans la deuxième partie de ma thèse, le rôle de CD81 associée au *tetraspanin web* dans l'infection du VHC. Le travail décrivant ces résultats a été soumis pour publication et est disponible dans la partie II des résultats :

Rocha-Perugini V., Lavie M., Delgrange D., Canton J., Pillez A., Rubinstein E., Dubuisson J., Wychowski C. and Cocquerel L. (2008). The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C Virus entry.

Objectifs du travail

RESULTATS

I. Article 1

**Le partenaire de CD81, EWI-2wint, inhibe
l'entrée du Virus de l'Hépatite C**

The CD81 Partner EWI-2wint Inhibits Hepatitis C Virus Entry

Vera Rocha-Perugini^{1,9}, Claire Montpellier^{1,9}, David Delgrange¹, Czeslaw Wychowski¹, François Helle¹, André Pillez¹, Hervé Drobecq¹, François Le Naour³, Stéphanie Charrin³, Shoshana Levy², Eric Rubinstein³, Jean Dubuisson^{1*}, Laurence Cocquerel^{1,2*}

1 Institut de Biologie de Lille (UMR8161), CNRS, Universités de Lille I et Lille II, Institut Pasteur de Lille, Lille, France, **2** Division of Oncology, Department of Medicine, Stanford University Medical Center, Stanford, California, United States of America, **3** INSERM-U602, Institut André-Lwoff, Université Paris XI, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

Abstract

Two to three percent of the world's population is chronically infected with hepatitis C virus (HCV) and thus at risk of developing liver cancer. Although precise mechanisms regulating HCV entry into hepatic cells are still unknown, several cell surface proteins have been identified as entry factors for this virus. Among these molecules, the tetraspanin CD81 is essential for HCV entry. Here, we have identified a partner of CD81, EWI-2wint, which is expressed in several cell lines but not in hepatocytes. Ectopic expression of EWI-2wint in a hepatoma cell line susceptible to HCV infection blocked viral entry by inhibiting the interaction between the HCV envelope glycoproteins and CD81. This finding suggests that, in addition to the presence of specific entry factors in the hepatocytes, the lack of a specific inhibitor can contribute to the hepatotropism of HCV. This is the first example of a pathogen gaining entry into host cells that lack a specific inhibitory factor.

Citation: Rocha-Perugini V, Montpellier C, Delgrange D, Wychowski C, Helle F, et al. (2008) The CD81 Partner EWI-2wint Inhibits Hepatitis C Virus Entry. *PLoS ONE* 3(4): e1866. doi:10.1371/journal.pone.0001866

Editor: Nina Papavasiliou, The Rockefeller University, United States of America

Received: August 9, 2007; **Accepted:** February 18, 2008; **Published:** April 2, 2008

Copyright: © 2008 Rocha-Perugini et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the "Institut Fédératif de Recherche-142" (IFR142) and by grants from the CNRS and the « Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales » ANRS. V R-P was supported by a fellowship from the « Institut Pasteur de Lille/Région Nord Pas-de-Calais ». DD was supported by a fellowship from the ANRS. FH was supported by a fellowship from the French Ministry of Research. JD is an international scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jean.dubuisson@ibl.fr (JD); laurence.cocquerel@ibl.fr (LC)

9 These authors contributed equally to this work.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is a global public health problem affecting over 130 million individuals worldwide; its symptoms including chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma [1]. Unfortunately, no vaccine is currently available to prevent new infections and the current treatments are not fully efficient [2]. Clearly, new therapeutic strategies are urgently required.

Over the past decade, due to the lack of a cell culture system supporting production of infectious virus particles, several surrogate models have been developed to facilitate analysis of the HCV life cycle. Among these models, pseudoparticles (HCVpp), consisting of native HCV envelope glycoproteins assembled onto retroviral core particles [3,4] have been useful in investigating the HCV entry process. More recently, however, production of infectious HCV particles in cell culture (HCVcc) has finally become possible [5,6,7]. This powerful system is based on the transfection of the human hepatoma cell line Huh-7 with the cloned JFH1 genome that replicates and produces infectious particles.

HCV encodes two envelope glycoproteins, E1 and E2, that interact to form a noncovalent E1E2 heterodimer [8] which is present at the surface of HCV particles [6], and is therefore the obvious candidate ligand for cellular receptor(s). Although the

early steps of viral entry have yet to be elucidated, several cell-surface expressed molecules have been proposed as entry factors for HCV (reviewed in [9]). Among these molecules, the tetraspanin CD81 and the scavenger receptor class B type I (SR-BI) have been shown to play major roles in HCV entry. However, co-expression of these two molecules in non-hepatic cell lines does not lead to HCV entry [10], suggesting that additional molecule(s) are involved in control of HCV entry. Recently, the tight-junction components Claudins (CLDN-1, CLDN-6, CLDN-9) have been identified as additional key factors for HCV infection [11,12]. Interestingly, CLDN-1 is the first entry factor shown to confer susceptibility to HCV when ectopically expressed in non-hepatic cells. Nevertheless, although CLDN-1 subcellular distribution seems to modulate HCV permissivity [13], some human cell lines expressing CD81, SR-BI and CLDN-1 remain resistant to HCV entry suggesting that one or more human-specific HCV entry factor(s) remain to be discovered [11].

CD81 belongs to the tetraspanin family. Members of this family organize and regroup their associated transmembrane proteins and are involved in various functions such as cell morphology, motility, fusion and signalling [14,15]. A major characteristic of tetraspanins is their ability to interact with each other and with other transmembrane proteins, thus building membrane multi-molecular complexes, collectively referred to as the tetraspanin web [16,17]. Within this network of interactions, tetraspanins form

primary complexes with a limited number of proteins termed tetraspanin partners. These primary interactions are direct, highly specific and occur at high stoichiometry. Two major partners have been identified for CD81, EWI-F (also called CD9P-1, FPRP or CD315) and EWI-2 (also called PGRL, IgSF8 or CD316) [18,19,20,21,22], which may provide a link between the tetraspanin web and the actin cytoskeleton by interacting with Ezrin, an Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) protein [23]. Although its function is still unclear, EWI-2 seems to participate in the regulation of cellular functions such as aggregation, spreading, motility and migration [24,25,26].

In this work, we identified a cleavage product of EWI-2, which associates with CD81 and inhibits its interaction with the HCV envelope glycoproteins. Most importantly, this molecule, that we called EWI-2wint (EWI-2 without its N-terminus), has an inhibitory effect on HCV entry, highlighting a potential new mechanism for the regulation of cellular invasion by this pathogen.

Results

A CD81 partner blocks the interaction between CD81 and HCV envelope glycoproteins

Tetraspanin microdomains are typically disrupted by Triton X-100 (TX), but are retained in less hydrophobic detergents such as Brij97 (Bj). In addition, the replacement of divalent cations (CaMg) by EDTA in the Brij97 lysis buffer causes a disruption of tetraspanin/tetraspanin interactions but conserves the tetraspanin/partner interactions [18] (Figure 1A). These biochemical properties allowed us to investigate whether the interaction between CD81 and E1E2 heterodimers is similar when CD81 is embedded or not in a tetraspanin web or in a primary complex. For this purpose, we analysed the interaction between E1E2 heterodimers and CD81 in several cell lines lysed in different detergent conditions (Figure 1A and Table 1). The E1E2 complexes were immobilized on agarose beads bound to a conformation-sensitive monoclonal antibody (mAb H53). Analysis of these agarose-bound complexes under non-reducing conditions [27] showed proper folding of the heterodimers in the different detergent conditions (data not shown). As positive and negative controls, we used anti-CD81 and irrelevant mouse (Cont) mAbs, respectively. A recombinant soluble form of the CD81 large extracellular loop (CD81-LEL) [28] was also used as a control. CD81 from Molt-4 and 293T cells interacted with E1E2 heterodimers under all detergent conditions, as did the CD81-LEL (Figure 1A). In contrast, CD81 from Daudi and Ramos cells did not interact with E1E2 heterodimers when tetraspanin webs or primary complexes were conserved (Figure 1A, Bj/CaMg and Bj/EDTA, respectively). Daudi cells also did not react with E1E2 glycoproteins derived from HCVpp (data not shown). Together, our results suggest that a CD81 partner, present on Daudi and Ramos cells, blocks the interaction between CD81 and HCV glycoproteins. Testing of other cell lines indicated that such a CD81 partner is probably also present in other cell lines such as A431, a squamous carcinoma cell line (Table 1).

To identify the CD81 partner blocking the interaction between CD81 and E1E2, we performed co-immunoprecipitation experiments using Bj/EDTA lysates from surface biotinylated cells. Under these conditions, only partners directly associated in primary complexes co-precipitate with CD81. In all cell lines, a 70-kDa surface protein, corresponding to EWI-2 [18,21] was co-precipitated with CD81 (Figure 1B). EWI-F, the second major CD81/CD9 partner [19,22] was also co-precipitated with CD81 and CD9 in 293T cells. To confirm the specificity of EWI-2 and EWI-F, these proteins were immunoprecipitated with specific

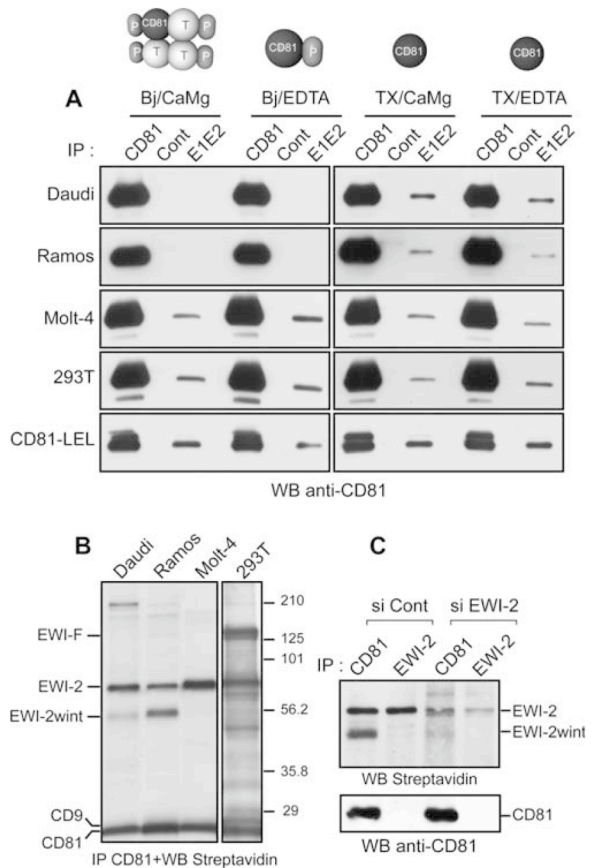


Figure 1. The interaction between HCV glycoproteins and CD81 is blocked when CD81 interacts with partner protein(s). **A**, HCV E1E2 heterodimers immobilized onto anti-E2 coated beads interacted with CD81 in all cells lysed in Triton X-100 (TX). However, the interaction of HCV-E1E2 with CD81 was blocked in Daudi and Ramos cells lysed in Brij (Bj). Maintenance of CD81 with other tetraspanins (T) and partners (P) is disrupted by the indicated lysis conditions, as diagrammed. Anti-CD81 and irrelevant (Cont) mAbs were used in immunoprecipitations as controls. Precipitation of CD81 was revealed by western blotting with the anti-CD81 5A6 mAb. CD81-LEL corresponds to the large extracellular loop of CD81 fused to the glutathione-S transferase. **B**, After cell surface biotinylation, the indicated cell lines were lysed with Bj/EDTA, immunoprecipitated with 5A6 mAb and the proteins revealed by Western blotting with HRP-conjugated streptavidin. The values on the right are molecular sizes in kilodaltons. **C**, EWI-2wint production is directly connected to EWI-2 expression. Daudi cells interfered with negative siRNA or EWI-2 siRNA were biotinylated, lysed in Bj/EDTA, immunoprecipitated with the anti-CD81 5A6 mAb or an anti-EWI-2 mAb (8A12) and blotted sequentially with HRP-conjugated streptavidin and 5A6 mAb. doi:10.1371/journal.pone.0001866.g001

mAbs 8A12 and 1F11, respectively (data not shown). Additional bands were also observed in these cells, but the identity of the corresponding proteins is unknown. Interestingly, an additional ~55 kDa surface protein co-precipitated with CD81 in Daudi and Ramos cells but not in Molt-4 and 293T cells. This protein, which we have named EWI-2wint, has been previously proposed as a cleavage product of EWI-2 that remains associated with CD81 and CD9 [18,21]. Furthermore, transfection of EWI-2 siRNA into Daudi cells reduced both the expression of EWI-2 and of EWI-

Table 1. *In vitro* interaction of HCV E1E2 heterodimers with CD81 and expression of cell markers.

Cell lines	E1E2/CD81 interaction ¹	SR-BI ²	Claudin-1 ²	CD81 ³	EWI-2 ³	EWI-2wint ⁴
Hematopoietic cell lines						
B cells						
Daudi	-	++	-	+	+	+
Ramos	-	++	-	+	+	+
OCI-LY8	+/-	++	-	+	+	+/-
T cells						
Jurkat	+/-	+/-	-	+	+	+/-
Molt-4	+	+/-	-	+	+	-
Myeloid cells						
U937	-	+/-	-	-	-	-
U937-CD81	+	+/-	-	+	-	-
PBMC	+/-	ND	ND	+	+	+/-
Non Hematopoietic cell lines						
Fetal kidney, 293T						
Fetal kidney, 293T	+	+	-	+	+	-
Squamous carcinoma, A431						
Squamous carcinoma, A431	-	+	+	+	+	+
Hepatocyte carcinoma						
Huh-7	+	++	+	+	+	-
HepG2-CD81	ND	ND	ND	+	+	-
PLC/PRF-5	ND	ND	ND	+	+	-
Primary hepatocytes						
Primary hepatocytes	+	+	+	+	+	-

¹The ratio [CD81 band intensity in E1E2 IP in Bj/EDTA buffer]/[CD81 band intensity in E1E2 IP in TX/EDTA buffer] was used to evaluate the E1E2/CD81 interaction: -, ≤0.1; +/-, >0.1-0.7<; +, ≥0.7

²Expression of SR-BI and Claudin-1 detected by WB with Cla-1 mAb and JAY.8 polyclonal Ab, respectively. Amount of each protein was compared to Huh-7 cells. The ratio [protein band intensity of the cell line]/[protein band intensity of Huh-7 cell line] was used: -, <0.1; +/-, ≥0.1-0.4<; +, ≥0.4-1<; ++, ≥1. Actin proteins were used for normalization.

³Cell surface expression of CD81 and EWI-2 proteins detected by flow cytometry with 5A6 and 8A12 mAbs, respectively. Analyses gave mean fluorescence intensities (MFI) in the range of 3-6 for negative controls and intensities over 10 for specific stainings.

⁴Expression detected by co-immunoprecipitation with CD81 as described in Figure 1B. The ratio [EWI-2wint band intensity]/[CD81 band intensity] was used to evaluate the expression of EWI-2wint: -, ≤0.01; +/-, >0.01-0.1≤; +, >0.1

doi:10.1371/journal.pone.0001866.t001

2wint (Figure 1C) demonstrating that EWI-2wint production is directly connected to EWI-2 expression. We performed additional co-immunoprecipitation experiments using different surface biotinylated cell lysates (Table 1). Co-immunoprecipitation of EWI-2wint with CD81 correlated with the inhibition of CD81-E1E2 interaction in mild detergents. Conversely, cells for which CD81 bound to E1E2 did not express this protein. It is worth noting that primary hepatocytes and hepatoma cells do not have detectable levels of EWI-2wint. We also analysed SR-BI and CLDN-1 expression in the same cell lines, and the lack of interaction between CD81 and E1E2 glycoproteins cannot be correlated with the absence of these molecules (Table 1, see squamous carcinoma, A431). Altogether, our results suggest that EWI-2wint probably corresponds to the CD81 partner blocking the interaction between CD81 and HCV glycoproteins.

EWI-2wint corresponds to EWI-2 with its amino-terminus deleted

To confirm that EWI-2wint is a cleavage product of EWI-2, we constructed an EWI-2 cDNA with a C-terminal FLAG epitope tag (EWI-2FLAG), as described previously [21]. CHO cells stably co-expressing human CD81 and EWI-2FLAG (CHO/CD81+EWI-2FLAG) were surface biotinylated, lysed in Bj/EDTA (Figure 2A) or TX/EDTA (Figure 2D) and analysed in immunoprecipitation experiments. Upon EWI-2FLAG coexpression with CD81,

EWI-2wint was detected following anti-FLAG immunoprecipitation or co-immunoprecipitation with CD81 (wint-FLAG ; Figure 2A). These results and Western blotting analyses (data not shown) showed that EWI-2wint still contains the C-terminal FLAG epitope, making EWI-2wint an authentic cleavage product of EWI-2. It is interesting to note that EWI-2wint was not recognized by our anti-EWI-2 mAb and that only a small fraction of CD81 co-immunoprecipitated with EWI-2 products, as previously observed [18]. Two smaller proteins of ~50, and 45 kDa, which remained associated with CD81 and probably correspond to additional cleavage products of EWI-2 were also detected (asterisks in Figure 2).

EWI-2 belongs to a novel family of immunoglobulin (Ig) proteins, which also includes EWI-F/CD9P-1/PGRL, EWI-101/CD101/V7 and EWI-3/IgSF3 [21]. The members of this family share a conserved EWI motif and contain an ectodomain composed of V-type Ig domains, a transmembrane domain and a short highly charged cytoplasmic tail [21]. EWI-2 contains 4 Ig domains (Figure 3).

To identify the sequence of EWI-2wint, EWI-2FLAG and wint-FLAG proteins were purified by immunoaffinity from a Triton X-100 lysate of CHO/CD81+EWI-2FLAG and fractionated by SDS-PAGE. The bands corresponding to EWI-2FLAG and wint-FLAG were excised after colloidal blue staining and digested with trypsin or V8 endoproteinase Glu C and the resulting peptides analysed by mass spectrometry (Table 2). Interestingly, only

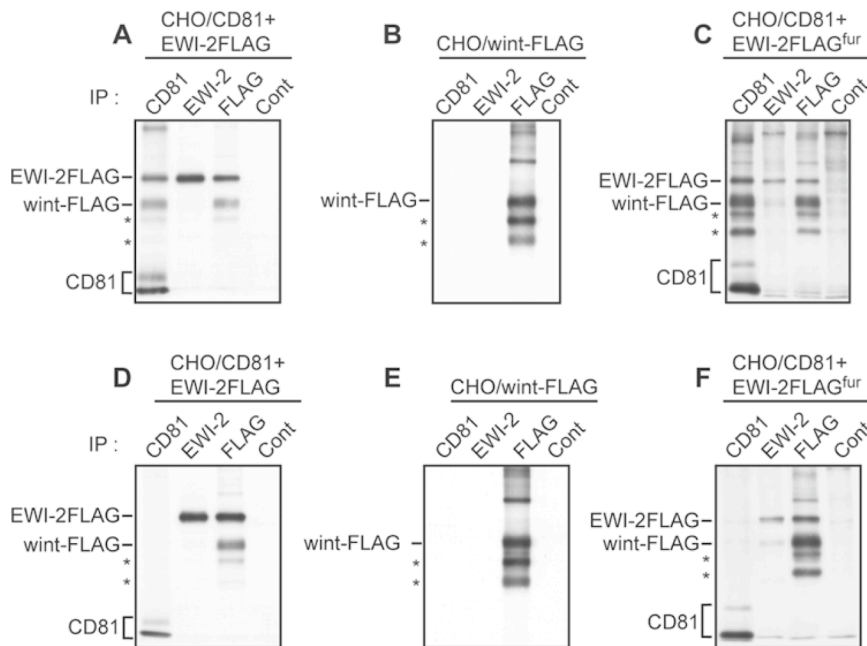


Figure 2. EWI-2wint is a cleavage product of EWI-2. CHO cells were (co)-transfected with pcDNA3.1/CD81 and pcDNA3.1/EWI-2FLAG (A and D), with pcDNA3.1/wint-FLAG (B and E), or with pcDNA3.1/CD81 and pcDNA3.1/EWI-2FLAG^{fur} (C and F). EWI-2FLAG^{fur} corresponds to EWI-2FLAG in which a furin cleavage site has been engineered. After cell surface biotinylation, cells were lysed with Bj/EDTA (A–C) or TX/EDTA (D–F) and proteins were immunoprecipitated with the indicated mAbs. Proteins were revealed by Western blotting with HRP-conjugated streptavidin. Asterisks indicate additional cleavage products of EWI-2. doi:10.1371/journal.pone.0001866.g002

peptides matching with the N-terminal membrane distal Ig domain (Ig 1 domain) of EWI-2 were not present in the wint-FLAG band, suggesting that this domain may be absent in the EWI-2wint protein. Indeed, sequencing of purified proteins by Edman degradation revealed that the N-terminal sequence of EWI-2wint corresponds to the QAPTS amino acids (Table 2) residues 166 to 170, which are located within the spacer separating the Ig1 and Ig2 domains of EWI-2 (Figure 3). Altogether, these results indicate that EWI-2wint corresponds to EWI-2 without its Ig 1 domain. Following these results, we chose to name this protein EWI-2wint for EWI-2 without its N-terminus.

Expression of EWI-2wint in HCV target cells

To characterize EWI-2wint, we cloned it as a FLAG-tagged protein in an expression vector (pcDNA3.1/wint-FLAG). CHO cells transfected with pcDNA3.1/wint-FLAG produced EWI-2wint and the two additional cleavage products (asterisks), as shown in Figure 2B and 2E. To further test the role of EWI-2wint in HCV infection, we tried to obtain hepatoma cells (Huh-7) stably expressing EWI-2wint. However, despite several attempts, EWI-2wint expression in cellular clones could not be detected by cell surface biotinylation and immunoprecipitation or by western blotting experiments (data not shown), suggesting that this protein was poorly expressed in these cells. To circumvent this problem, we added a single Arg residue into the EWI-2FLAG sequence directly upstream to Q¹⁶⁶ amino acid (asterisk, Figure 3), making an EWI-2FLAG protein with a RGRR cleavage motif for furin (pcDNA3.1/EWI-2FLAG^{fur}), a trans-Golgi network associated endopeptidase. This strategy, when tested in CHO cells transfected with pcDNA3.1/EWI-2FLAG^{fur}, yielded a high amount of the EWI-2wint protein, as shown in Figure 2C and 2F. Furthermore,

EWI-2wint could be detected by direct immunoprecipitation or by co-immunoprecipitation with CD81 in Huh-7 cells stably expressing EWI-2FLAG^{fur} (wint-FLAG, Figure 4D). Almost no whole EWI-2FLAG protein reached the surface of Huh-7/EWI-2FLAG^{fur} cells, indicating that the cleavage of EWI-2FLAG^{fur} by furin was highly efficient in these cells. It should be noted that at least one additional cleavage product of EWI-2FLAG (asterisk, Figure 4D) was detected as in CHO cells. The association of one or two additional cleavage products with the production of EWI-2wint suggests that the first cleavage of EWI-2 allows the unmasking of one or two additional sites that are not accessible in the whole protein. In contrast, Huh-7 cells (Figure 4A), Huh-7 stably transfected with the empty vector (pcDNA3.1, Figure 4B) or with EWI-2FLAG, expressing a N-terminal HA epitope (HAEWI-2FLAG, Figure 4C) were devoid of EWI-2wint. In Huh-7 cells stably transfected with HAEWI-2FLAG, the tagged molecule was detected following co-immunoprecipitation with CD81 or by direct immunoprecipitation with anti-FLAG or anti-HA mAbs, as compared to control cells (Figure 4). The anti-CD81 and anti-FLAG antibodies precipitated different amounts of wint-FLAG in Huh-7/EWI-2FLAG^{fur} cells (Figure 4D). This might be due to differences in the affinity of the antibodies, as has been previously observed when EWI-2 and CD81 were coprecipitated [18]. Alternative possibilities are that i) homodimerization and heterodimerization of EWI-2 and CD81 modulate recognition by antibodies, as described [29,30], ii) binding of the anti-FLAG mAb at the C-terminus of EWI-2wint induces a dissociation of the CD81/EWI-2wint complexes.

EWI-2wint inhibits HCV infection

We then sought to determine whether EWI-2wint is able to modulate HCV infection of Huh-7 target cells. Originally we used

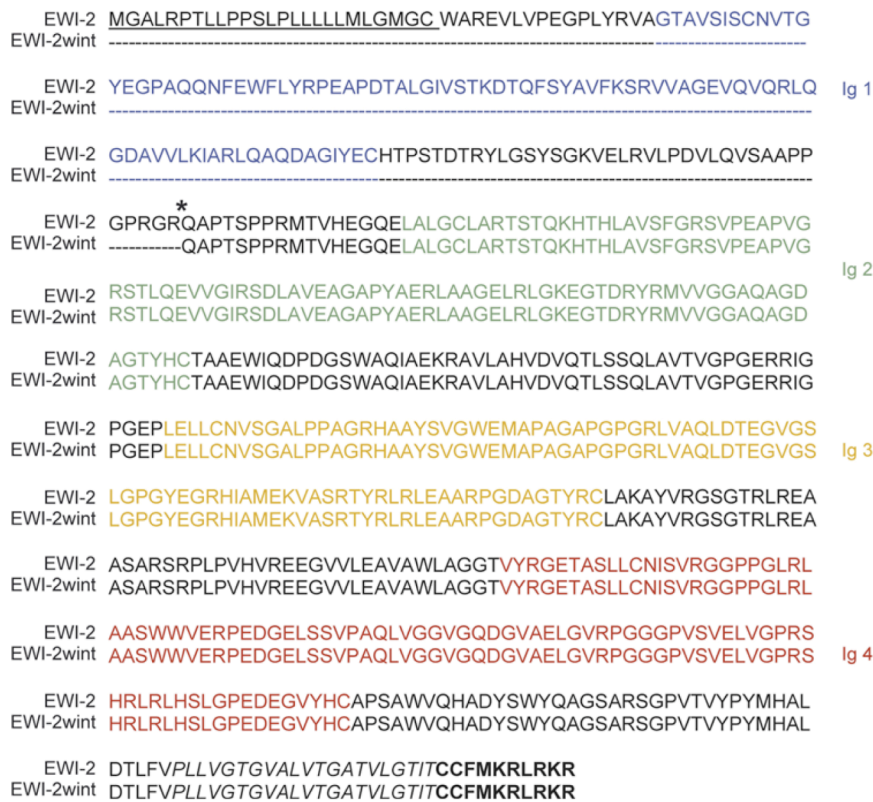


Figure 3. Alignment of EWI-2 sequence and the deduced EWI-2wint sequence. Asterisk indicates the position at which an Arg (R) residue was introduced to make a furin cleavage site. Underlined amino acids correspond to the signal peptide of EWI-2. The four Ig domains are colored. Amino acid residues corresponding to the putative transmembrane domain are in italics and those corresponding to the cytoplasmic tail are bolded. doi:10.1371/journal.pone.0001866.g003

cell culture produced HCV particles (HCVcc) [5,6,7] to infect Huh-7 cells expressing EWI-2FLAG^{fur}, HAEWI-2FLAG, pcDNA3.1 or naïve Huh-7 cells. In the absence of a reporter gene in HCVcc, infection levels were evaluated by immunofluorescence (Figure 5A) and western blotting (Figure 5B), 40 h post-infection. Interestingly, we observed a reduction in HCVcc infection level in cells expressing EWI-2FLAG^{fur}, whereas it remained unmodified in control cells (Figure 5C). It is worth noting that in HAEWI-2FLAG cells, the HCVcc infection level was similar to that of pcDNA3.1 cells, indicating that ectopic expression of HAEWI-2FLAG does not affect HCV infection. In addition, flow cytometry analyses ruled out any potential bias due to different levels of CD81 cell surface expression on clones (Figure 5D). Altogether, these results indicate that EWI-2wint produced in Huh-7/EWI-2FLAG^{fur} cells inhibits HCV infection.

EWI-2wint blocks HCV entry into target cells

The life cycle of HCV can be divided into three major steps : entry of the virus into its target cells by receptor-mediated endocytosis, cytoplasmic and membrane-associated replication of the RNA genome, and assembly and release of the progeny virions.

To analyze the effect of EWI-2wint expression on HCV genome replication, we compared the efficiency of RNA replication and virus production between transfected cell lines expressing or lacking EWI-2wint. We transfected equal amounts of RNA corresponding to the full-length JFH1 genome [6] into the

different cell lines (Figures 6A and 6B). Immunofluorescence analyses of transfected cells showed similar positivity for HCV anti-core antibody at 40 h post-transfection. Flow cytometry analyses using an anti-NS3 mAb showed that, although slightly stronger in Huh-7 cells, viral expression was similar in cellular clones that lacked or expressed EWI-2wint (Figure 6B), indicating that EWI-2wint does not affect HCV genome replication. Next, to assess the effect of EWI-2wint on the assembly and/or egress of particles, the culture medium of each transfected cell line was harvested and used to infect naïve Huh-7 cells. Through core-specific immunofluorescence staining, we found that Huh-7 cells were similarly infected by virus produced from all transfected cellular clones (data not shown), suggesting that EWI-2wint does not affect HCV assembly and release.

Our observations indicate that EWI-2wint likely affects an early step in the HCV life cycle. To test this hypothesis, we analyzed the effect of EWI-2wint on the infectivity of retroviral particles pseudotyped with HCV E1E2 proteins (Figure 6C). Use of HCVpp enables the analysis of the HCV entry step. We generated particles pseudotyped with HCV envelope glycoproteins from 1a and 2a genotypes (HCVpp 1a and HCVpp 2a, respectively) and control particles pseudotyped with the envelope glycoprotein G of vesicular stomatitis virus (VSVpp). As shown in Figure 6C, HCVpp infectivity was reduced in cells expressing EWI-2wint whereas it remained unmodified in control cells. Expression of EWI-2wint in target cells had no effect on VSVpp infectivity. It is interesting to note that HAEWI-2FLAG expression slightly

Table 2. Mass spectrometric analyses and N-terminal sequencing of EWI-2 and EWI-2wint proteins

SEQUENCE	POSITION	MASS	ENZ	EWI-2	EWI-2wint
EVLVPEGPLYR	29–39	1271	Tryp	+	-
DTQFSYAVFK	83–92	1205	Tryp	+	-
VWAGEVQVQR	95–104	1084	Tryp	+	-
LQAQDAGIYECHTPTSDTR	117–135	2163	Tryp	+	-
VLPDVLQVSAAPPGR	148–163	1615	Tryp	+	-
MTVHEGQELALGCLAR	174–189	1784	Tryp	+	+
MTVHEGQELALGCLAR	174–189	1800	Tryp	+	+
HTHLAVSFGR	195–204	1124	Tryp	+	+
SVPEAPVGR	205–213	911	Tryp	+	+
STLQEVVGR	214–223	1101	Tryp	+	+
SDLAVEAGAPYAER	224–237	1448	Tryp	+	+
LAAGELR	238–244	729	Tryp	+	+
MVVGGAQAGDAGTYHCTAAEWIQDPDGSWAQIAEK	255–289	3690	Tryp	+	+
AVLAHVDVQTLSSQLAVTVGPGER	291–314	2447	Tryp	+	+
HAAYSVWEMAPAGAPGPR	338–357	1981	Tryp	+	+
HAAYSVWEMAPAGAPGPR	338–357	1997	Tryp	+	+
LVAQLDTEGVSLGPGYEGR	358–377	2018	Tryp	+	+
LEAARPGDAGTYR	393–405	1376	Tryp	+	+
SRPLPVHVR	427–435	1060	Tryp	+	+
GGPPGLR	468–474	653	Tryp	+	+
LHSLGPEDEGVYHCAPSAWVQHADYSWYQAGSAR	531–564	3844	Tryp	+	+
AVVLKIARLQAQD	109–121	1424	Glu-C	+	-
CHTPSTDTRYLGSYSGKVE	127–145	2157	Glu-C	+	-
VVGIRSDLAVE	219–229	1157	Glu-C	+	+
GSWAQIAEKRAVLAHVD	281–297	1850	Glu-C	+	+
MAPAGAPGGRVLAQLDTE	347–365	1866	Glu-C	+	+
AASARSRPLPVHVREE	422–437	1774	Glu-C	+	+
AVAWLAGGTVYRGE	443–456	1449	Glu-C	+	+
LGVRPGGGPVSVVE	508–520	1223	Glu-C	+	+
LVGPRSHRLRLHSLGPEDE	521–539	2168	Glu-C	+	+
N-term				REVLV	QAPTS

Tryp: trypsin; Glu-C: V8 endoproteinase Glu C
doi:10.1371/journal.pone.0001866.t002

increased HCVpp and VSVpp infectivity. Altogether, our results indicate that EWI-2wint inhibits the entry stage of HCV lifecycle, likely by interacting with CD81.

To determine whether the lower level of HCV infection observed in EWI-2wint producing cells resulted from a reduced interaction between HCV glycoproteins and CD81, we compared the interaction between E1E2 and CD81 in Huh-7/pcDNA3.1 and Huh-7/EWI-2FLAG^{fluc} cells, as detailed in Figure 1. Interestingly, our results demonstrated reduced interaction between E1E2 and CD81 in Huh-7/EWI-2FLAG^{fluc} cells lysed in Bj/EDTA which conserves tetraspanins/partners interactions, as compared to cells lysed in TX/EDTA (Figure 6D). In contrast, the binding of E1E2 to CD81 was similar in Huh-7/pcDNA3.1 cells in both detergent conditions. These data indicate that the inhibition of HCV infection by EWI-2wint correlates with its capacity to inhibit the interaction between E2 glycoprotein and CD81.

In order to carry out statistical analyses of EWI-2wint effect on HCV infection, we next generated JFH1-based *Renilla* luciferase (R-Luc) reporter HCVcc and infected Huh-7 cells that lacked or

expressed EWI-2wint (Figure 7A). Cellular populations (pcDNA3.1, HAEWI-2FLAG and EWI-2FLAG^{fluc} POP) and individual cellular clones (EWI-2FLAG^{fluc} A1, A6, B14, C1) have been used in these experiments. In parallel, we infected these cells with HCVpp 1a, HCVpp 2a or VSVpp (Figure 7B), as described in Figure 6. Our results showed that EWI-2wint expression inhibits HCVcc infectivity up to 80% (Figure 7A; EWI-2FLAG^{fluc} A6) confirming our previous findings (Figure 5). It is noteworthy that EWI-2wint was less effective, reducing HCVpp infectivity only by 40–50% (Figure 7B; EWI-2FLAG^{fluc} A1), which might be due to slight differences between HCVpp and HCVcc in the entry stages, as recently reported by others [31]. Once again, this study shows that EWI-2wint expression in Huh-7 cells leads to a significant reduction of HCV infection.

Discussion

Here, we identified a novel CD81 associated protein, EWI-2wint, which is able to inhibit HCV entry into target cells by

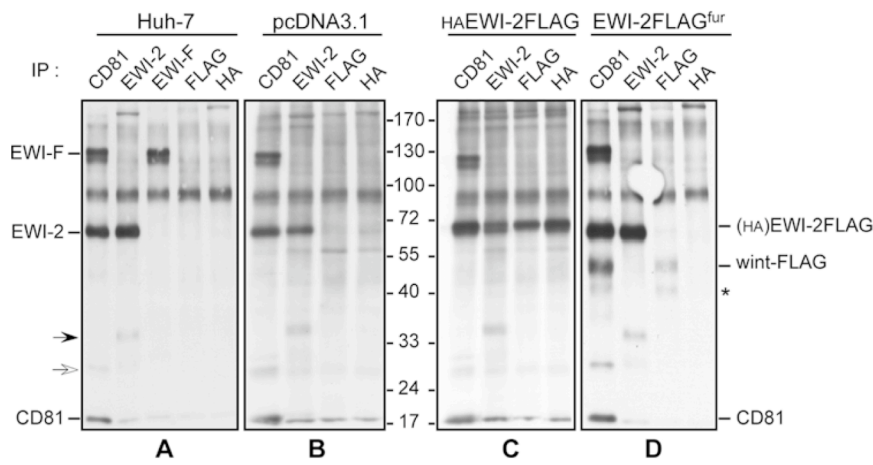


Figure 4. EWI-2wint expression in Huh-7 cells. After cell surface biotinylation, Huh-7 cells (A) stably expressing pcDNA3.1 (B), HA-EWI-2FLAG (C) or EWI-2FLAG^{fur} (D) were lysed with Bj/EDTA and analyzed by immunoprecipitation with indicated mAbs. Proteins were revealed by Western blotting with HRP-conjugated streptavidin. The molecular weights of the prestained molecular ladder are indicated in kDa. The asterisk indicates an additional cleavage product of EWI-2. The band indicated by a light arrow likely corresponds to a dimer of CD81, and the band indicated by a full arrow to an unidentified EWI-2 associated protein.
doi:10.1371/journal.pone.0001866.g004

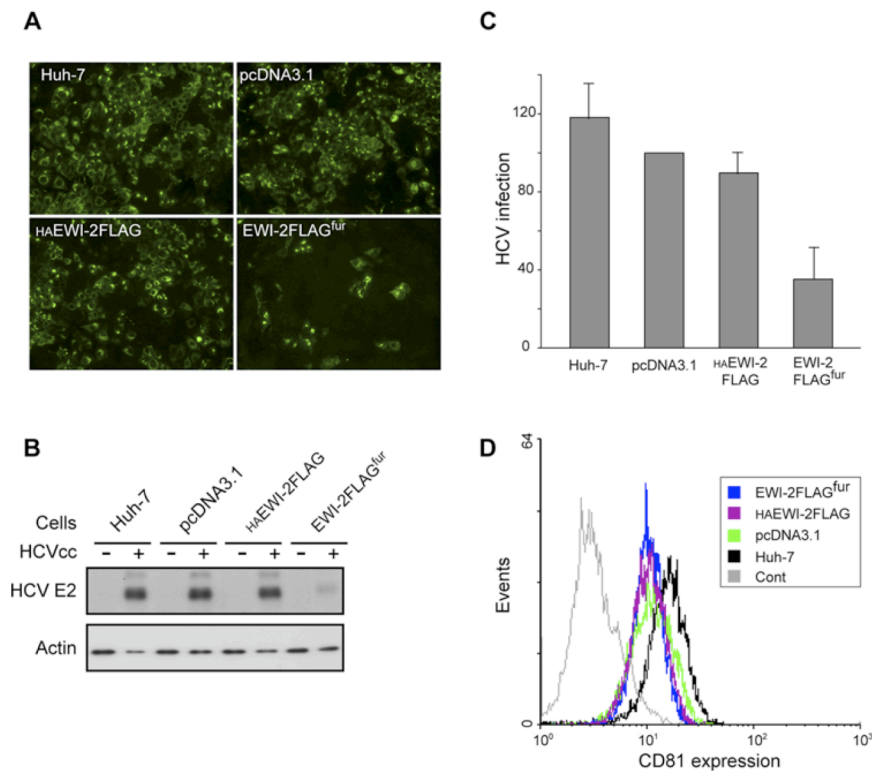


Figure 5. EWI-2wint inhibits HCVcc infection. Cell clones were infected with JFH1 HCVcc and infectivity was analyzed by indirect immunofluorescence with an anti-C mAb (A) or Western blotting with an anti-E2 mAb (B). The fields displayed in (A) contained similar numbers of cells. C, Infection levels were measured by quantification with NIH Image 1.62 of the intensities of HCV E2 bands. The results are presented as percentages of HCVcc infection relative to the infection of Huh-7/pcDNA3.1 cells. Infection levels of three independent experiments are reported as the mean with standard deviation bars. D, CD81 expression on the surfaces of cells expressing or not EWI-2wint. Cells were stained by using an anti-CD81 mAb (5A6) and secondary antibody conjugated with PE. Cont corresponds to Huh-7 cells that were stained only with the secondary antibody.
doi:10.1371/journal.pone.0001866.g005

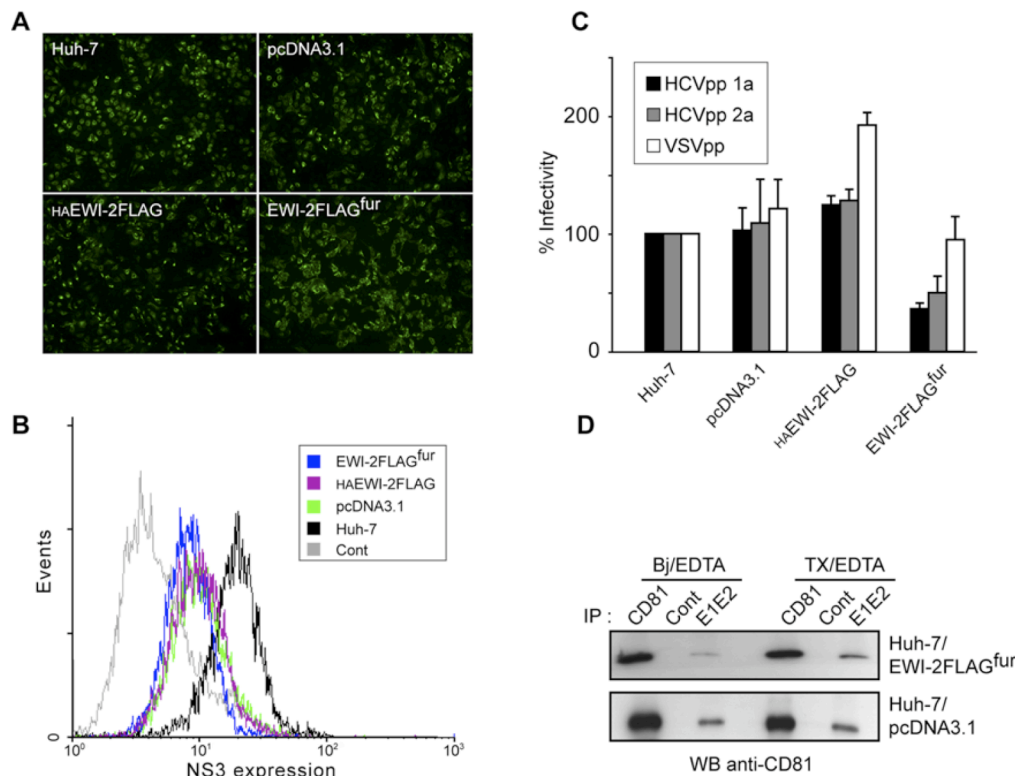


Figure 6. EWI-2wint inhibits the entry stage of HCV life cycle by reducing the interaction between E1E2 and CD81. **A**, EWI-2wint does not interfere with HCV replication. The indicated Huh-7 cell lines were transfected with the full-length JFH1 genome, and expression of the core antigen was evaluated at 40 h post-transfection. The displayed fields contained similar numbers of cells. **B**, NS3 expression in JFH-1 transfected cells. Cells were stained by using an anti-NS3 mAb (486-D39) and secondary antibody conjugated with PE. Cont corresponds to untransfected Huh-7 cells. **C**, Huh-7 cell lines were incubated for 3 h with virus pseudotyped with HCV envelope glycoprotein (HCVpp) or VSV G envelope protein (VSVpp). HCVpp were generated with envelope proteins from 1a (HCVpp 1a) or 2a (HCVpp 2a) genotype. The inoculum was then removed and the cells were further incubated. At 2 days post-inoculation, cells were lysed and processed to measure the luciferase activity. The luciferase activities were normalized for protein concentration in each cell lysate. The results are presented as relative percentages to HCVpp infectivity on Huh-7 cells. Results are reported as the mean \pm S.D. of three independent experiments. Pseudotyped particles produced in the absence of envelope proteins were used as controls. The mean fluorescence activity of such particles represented less than 2% of the activity measured for HCVpp. **D**, *In vitro* interaction of E1E2 heterodimers with CD81 from Huh-7/EWI-2FLAG^{fur} and Huh-7/pcDNA3.1. This assay was performed as described in Figure 1. The ratio [CD81 band intensity in E1E2 IP in Bj/EDTA buffer]/[CD81 band intensity in E1E2 IP in TX/EDTA buffer] was 0,27 and 0,84 in Huh-7/EWI-2FLAG^{fur} and Huh-7/pcDNA3.1, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0001866.g006

blocking the interactions between HCV glycoproteins and CD81. This finding indicates that the early steps of HCV entry into its target cells involve tight control of CD81 accessibility to the viral particle.

EWI-2wint may inhibit HCV entry by reducing E1E2-CD81 interactions for a number of possible reasons. EWI-2wint may reduce CD81 accessibility to envelope glycoproteins by steric hindrance. Alternatively, the association of EWI-2wint with CD81 may induce conformational modifications in CD81, blocking the binding of HCV heterodimers. Although the exact role of CD81 in the course of virus infection is not well defined, it is a key molecule required for productive infection by HCVpp and HCVcc of Huh-7 cells [3,4,5,6,7,10,32]. Moreover, most recently CD81 was shown to be required for the infection of primary hepatocytes by serum-derived HCV [33]. Previous studies have suggested that CD81 may not be required for the first attachment step, but rather function as a post-attachment entry co-factor [34,35,36]. Very recently, it has been shown that CLDN-1, 6 and 9 membrane proteins localized at tight junctions, are additional entry factors for

HCV [11,12,37], indicating that HCV entry might involve a complex multistep process. CD81 might potentially be required for a post-binding step such as escorting the particle into the endocytic pathway or priming it for the pH triggered fusion mechanism. The association of EWI-2wint with CD81 could block such entry stages. Since our preliminary results suggest that CD81 and EWI-2wint likely colocalize in an endosomal compartment (unpublished data), EWI-2wint might exert its inhibitory effect on CD81 functionality in the endosomes. In addition, EWI-2wint may interfere with actin polymerization potentially required for HCV entry. Indeed, HCV replication requires microtubule and actin polymerization [38] and CD81 engagement leads to actin rearrangement [39,40]. Furthermore, it has also recently been shown that CD81 and EWI-2 interact with Ezrin, an actin-linking ERM protein [23]. Lastly, we cannot exclude the possibility that EWI-2wint blocks other signaling pathways necessary for viral entry.

EWI-2wint is a cleavage product of the EWI-2 protein. The proteolytic cleavage of EWI-2 Ig1 domain occurs downstream of

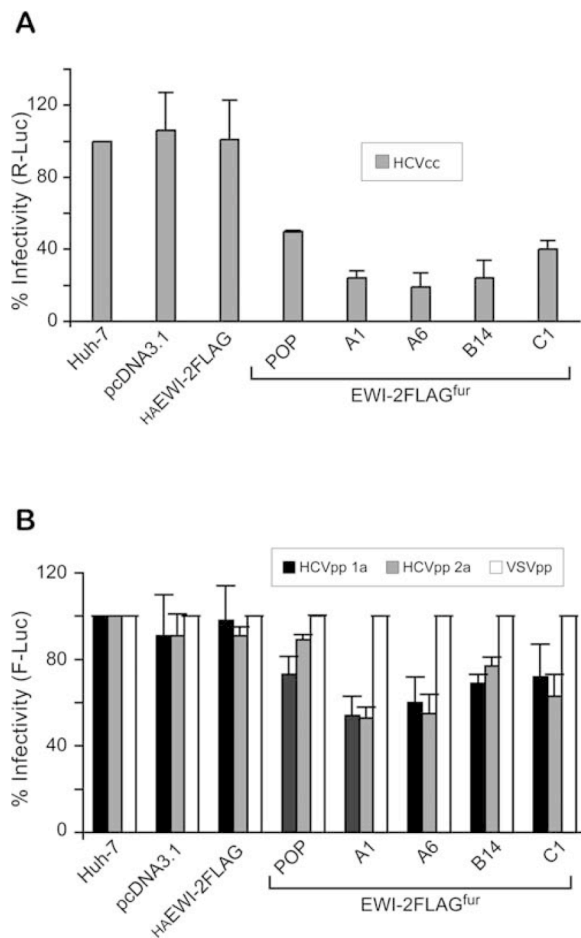


Figure 7. EWI-2wint inhibits the infection of both HCVcc and HCVpp. **A**, Cellular populations (pcDNA3.1, HAEWI-2FLAG and EWI-2FLAG^{fur} POP) and individual cellular clones (EWI-2FLAG^{fur} A1, A6, B14, C1) were infected with HCVcc expressing *Renilla* luciferase (R-Luc). In parallel, these cells were infected with HCVpp 1a, HCVpp 2a or VSVpp expressing firefly luciferase (F-Luc) (**B**), as described in Figure 6. At 2 days post-infection, cells were lysed and processed to measure the luciferase activity. The luciferase activities were normalized for protein concentration in each cell lysate. The results are presented as relative percentages to HCVcc (A) and HCVpp (B) infectivity on Huh-7 cells. HCVpp infections (B) were also normalized to VSVpp infections on Huh-7 cells. Results are reported as the mean±S.D. of three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0001866.g007

the RGR amino acids. A site directed mutagenesis analysis showed that RXR (where X is any amino acid) correspond to the consensus site recognized by the protease involved in this cleavage (unpublished data). Further analyses using protease inhibitors and small interference RNAs should enable us to identify this protease. Pulse-chase experiments in CHO cells showed that the cleavage occurs after N-glycan maturation (unpublished data), suggesting that it likely involves a Golgi resident protease. We showed that a RGRR furin cleavage motif made by insertion of an Arg residue into the EWI-2 sequence allows efficient production of EWI-2wint and additional cleavage product(s) in Huh-7 cells. As shown here, EWI-2 can be cleaved at RGR site to produce EWI-2wint, and it is likely that a furin-like protease may be responsible for this

cleavage. Such a protease may be expressed differently among cell types, such that liver cells lacking the enzyme are consequently more sensitive to HCV infection. On the other hand, the accessibility of EWI-2 to protease(s) may be cell-type specific and might be modulated by other components of the tetraspanin webs that vary in different cell types [14,16].

Although several molecules have already been implicated in the entry process of HCV, it is likely that additional specific factors regulate its entry into hepatic cells [41]. Silencing of endogenous EWI-2 in Huh-7 cells did not significantly affect HCVcc infection (data not shown) indicating that while being a major partner of CD81, EWI-2 is likely not involved in the HCV entry process. Here, we showed that EWI-2wint, present in some cell lines and absent from hepatic cells, is able to inhibit HCV entry. The production of a mAb directed against EWI-2wint will be essential to further analyse the expression profile of EWI-2wint in various tissues and cell lines. Nevertheless, our results suggest that, in addition to the presence of specific entry factors in the hepatocytes such as CD81, SR-BI, CLDN-1 and additional unidentified molecule(s), the absence of a specific inhibitor can also contribute to the hepatotropism of HCV. Interestingly, 293T cells, that are permissive for HCV entry when they express CLDN-1 [11], do not express EWI-2wint (Table 1). Further experiments with HCV non permissive cells expressing all known positive entry factors will be necessary to determine if the silencing of endogenous EWI-2wint is sufficient to induce HCV permissivity.

In conclusion, our observation constitutes a basis for the rational design of new antiviral molecules. Moreover, it represents a new mechanism that contributes to the regulation of the entry of a pathogen into a host cell.

Materials and Methods

Cells and antibodies

U937-CD81 cells have been described previously [42]. Primary hepatocytes were isolated from three human foetal livers (Advanced Bioscience Resources, Inc, Alameda, CA). HepG2-CD81 [10] have been described previously and were kindly provided by F-L. Cosset.

The mAbs used in this study included: 5A6 (anti-CD81 [43]), 8A12 (anti-EWI-2 [18]), 1F11 (anti-EWI-F [19]), H53 (anti-HCV E2 [44]), 3/11 (anti-HCV E2, kindly provided by J. McKeating [45]), ACAP27 and 486-D39 (anti-HCV core and HCV NS3, respectively, kindly provided by JF Delagneau [46]). The anti-beta actin (clone AC-15), the M2 anti-FLAG epitope mAb and the M2 anti-FLAG affinity gel were from Sigma. The HA11 (anti-HA, Clone 16B12) mAb was from Covance. The anti-claudin-1 (JAY.8) was from Zymed Laboratories. The anti-SR-BI (Cla-1) was from BD Transduction Laboratories.

Plasmids

pcDNA3.1/CD81 plasmid has been described previously [18]. EWI-2 was FLAG-tagged (DYKDDDDK) at its C-terminus by polymerase chain reaction (PCR) amplification from template pCMVSPORT6/EWI-2 [18] and subcloned into a pcDNA3.1 vector (pcDNA3.1/EWI-2FLAG). Three Gly residues were introduced between EWI-2 and FLAG epitope sequences to increase epitope accessibility. Plasmid pcDNA3.1/wint-FLAG encoding EWI-2 signal peptide (amino acids 1–25) and EWI-2 amino acids 166–613 fused to FLAG tag was made by fusion-PCR from template pcDNA3.1/EWI-2FLAG. pcDNA3.1/HAEWI-2FLAG encodes EWI-2 signal peptide followed by HA9 epitope (YPYDVPDYA) tag fused to the entire sequence of EWI-2FLAG. Three Gly residues were also introduced between HA epitope and EWI-

2FLAG sequence. In pcDNA3.1/EWI-2FLAG^{fluc} plasmid, an Arg residue was introduced between EWI-2 amino acids 165 and 166. Cloning details and oligonucleotide sequences are available upon request.

Cell transfection

CHO cells were transfected using ExGen500 (Eurogentec). CHO/CD81+EWI-2FLAG cell line was obtained by selection for 2 weeks with 500 µg/ml hygromycin and 800 µg/ml neomycin. The resulting cells were maintained in selection media as a polyclonal population. For stably transfected Huh-7 cells, cells were electroporated using the Gene Pulser apparatus (Bio-Rad) and neomycin was added 48 hours post-transfection at 600 µg/ml. After 2 weeks, isolated clones were split using selection cylinders and maintained in neomycin medium.

CD81-E1E2 interaction assay

COS-7 cells were infected with a recombinant adenovirus (Ad) expressing the HCV proteins E1, E2, p7 and NS2 (Ad/E1E2p7NS2, amino acids 171–1026) [27] at a multiplicity of 25PFU per cell. At 48 h post-infection, cells were washed twice with ice-cold Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS), and lysed in one of the following lysis buffers: 1% Brij97 in D-PBS with calcium and magnesium (Bj/CaMg) or with 2 mM EDTA (Bj/EDTA), 1% Triton X-100 in D-PBS with calcium and magnesium (TX/CaMg), or with 2 mM EDTA (TX/EDTA). Clarified lysates were then incubated with mAb H53 pre-adsorbed onto rabbit anti-mouse protein A-sepharose overnight at 4°C (beads-E1E2). In parallel, rabbit anti-mouse-protein A beads were incubated with mAb 5A6 (beads-CD81) or an irrelevant control mouse mAb (beads-Cont). Cell lines were lysed in Bj/CaMg, Bj/EDTA, TX/CaMg or TX/EDTA lysis buffer at 10×10⁶ cells/ml, clarified and incubated with beads-E1E2, beads-CD81 and beads-Cont for 6 h at 4°C. After rinsing five times with the lysis buffer, complexes were eluted in non-reducing sample buffer, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted with mAb 5A6.

Detection of cell surface biotinylated proteins

Cells were biotinylated as previously described [19] with 0.2 mg/ml EZ-link-Sulpho-NHS-LC-biotin (Pierce), and lysed into Bj/EDTA or TX/EDTA containing protease inhibitors (Complete, Roche). Lysates were precleared for 2 h at 4°C with protein A-sepharose (Amersham Biosciences) then incubated with mAbs pre-adsorbed onto rabbit anti-mouse-protein A beads for 2 h at 4°C. After rinsing, complexes were eluted, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted with peroxidase-conjugated streptavidin (Vector).

EWI-2 silencing

To silence the expression of endogenous EWI-2 protein, Daudi cells were electroporated with negative siRNA directed against the FLAG epitope (5' AUUACAAGGACGACGAUGA 3', Dharmacon) and EWI-2 siRNA directed against the sequence 5' GUUCUCCUAUGCUGUCUU 3' (Dharmacon) corresponding to nucleotide sequence 253–270 of the ORF of EWI-2 [23]. Daudi cells were electroporated at 4°C using the Gene Pulser apparatus (400V, 950µF). Seventy two hours post-transfection, cells were biotinylated, lysed in Bj/EDTA and immunoprecipitated with 5A6 and 8A12 mAbs. Immunoprecipitated proteins were revealed by Western blotting with peroxidase-conjugated streptavidin or 5A6 mAb.

Flow cytometry analysis

After trypsinization, transfected cells were fixed with Formalin Solution (formaldehyde 4%, Sigma) and permeabilized with PBS 0.2% BSA 0.05% Saponin. After rinsing with PBS 2% BSA 2 mM EDTA, cells were incubated 1 h at 4°C with 486-D39 anti-NS3 mAb. After rinsing with washing solution, cells were incubated with PE labeled goat anti-mouse (BD Pharmingen) for 45 min at 4°C, then washed and fixed with Formalin Solution. For CD81 staining, cells were detached with PBS 2 mM EDTA and incubated 1 h at 4°C with 5A6 anti-CD81 mAb. After rinsing with washing solution, cell lines were incubated with PE labeled goat anti-mouse for 45 min at 4°C, then washed and fixed with Formalin Solution (PFA 10%, Sigma). Cells stained only with the secondary antibodies were used as negative control. Labeled cells were analyzed using a FACS Beckman EPICS-XL MCL.

Protein purification, mass spectrometry and N-terminal sequencing

For purification of EWI-2FLAG and wint-FLAG, ~2×10⁸ CHO/CD81+EWI-2FLAG cells were lysed in 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6 (TBS), 1 mM EDTA and 1% Triton X-100 in the presence of protease inhibitors. Clarified cell lysates were precleared for 2 h at 4°C with protein A-sepharose and then incubated with an anti-FLAG M2 affinity gel for 2 h at 4°C. After five washes with TBS containing 0.2% Triton X-100 (TBS-T), FLAG-tagged proteins were eluted with 100 µg/ml FLAG peptide (Sigma) in TBS-T. Purified proteins were then precipitated with 5 volumes of acetone, incubated overnight at -20°C, and centrifugated. After rinsing with 80% acetone, proteins were resuspended in sample buffer, and resolved by SDS-PAGE. Colloidal blue stained bands corresponding to EWI-2FLAG and wint-FLAG were then excised from the gel, reduced, alkylated with iodoacetamide (10 mg/ml in NH₄HCO₃, 20 mM) and digested overnight with 50 ng trypsin (Promega) in 20 mM NH₄HCO₃, or 100 ng V8 endoproteinase Glu C (Roche) in 0.1 M phosphate buffer pH7.7. The resulting peptide mixture was eluted from the gel, desalted, and spotted on a MALDI plate with freshly dissolved α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (5 mg/ml in 50% CH₃CN, 20 mM citric acid). The dried spot was then washed with 20 mM di-ammonium citrate pH 4.5. Mass spectrometry was performed with a MALDI-TOF Voyager-DE-STR (Applied Biosystems). Spots were analysed by setting the following parameters: positive and reflector modes, acceleration voltage of 20KV, grid voltage of 61%, 90 ns of delayed extraction, low mass gate 500 amu. The laser energy required to desorb/ionise the samples was kept at low value, compatible with a good signal/noise ratio. Spectra were calibrated externally by using the [M+H]⁺ monoisotopics ions from trypsinized lysozyme. The theoretical list of digested peptides was obtained using MS-Digest <http://128.40.158.151/ucsfhtml3.4/msdigest.htm>. For N-terminal sequencing, purified proteins were transferred to PVDF and stained with amido black. Blotted EWI-2FLAG and wint-FLAG were sequenced in a Procise 492 sequanator (Applied Biosystems) using pulsed-liquid method.

JFH-1 infection

The plasmid pJFH1, containing the full-length cDNA of JFH1 isolate (genotype 2a) and kindly provided by T. Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Japan), was used to generate HCVcc as described [6,47]. Infectious titers of viral stocks were estimated between 10³ and 10⁶ focus-forming units per ml, based on immunofluorescent detection of infected foci following infection of Huh-7 cells with serial dilutions of viral stocks. Cell lines were

incubated with HCVcc (m.o.i. = 1) for 2 h at 37°C, washed and incubated for additional 40 h at 37°C. Infections were scored by indirect immunofluorescence with anti-C mAb ACAP27 followed by Alexa⁴⁸⁸-conjugated goat anti-mouse (Jackson Immuno-research). Fifteen micrograms of total protein were also analyzed by immunoblotting with 3/11 mAb followed by peroxidase-conjugated goat anti-rat immunoglobulins (Jackson Immuno-research). The blots were then stripped and reprobed with an anti-beta actin followed by peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins (Sigma). Quantification of protein expression was performed using NIH Image 1.62 from the band mean densities.

To generate HCVcc expressing *Renilla* luciferase, we used the FL-J6/JFH-5' C19Rluc2Aubi genome [48] kindly provided by C.M. Rice. We replaced the region encoding the J6/JFH-1 HCV polyprotein with the CS-N6 JFH-1 sequence [47]. HCVcc were produced as described [6,47,48]. HCVcc were added to Huh-7 cells (m.o.i. = 1) seeded the day before in 24-well plates and incubated for 2 h at 37°C. The supernatants were then removed and the cells were incubated in DMEM 10% FBS at 37°C. At 40–48 h post-infection, *Renilla* luciferase assays were performed as indicated by the manufacturer (Promega).

HCVcc replication analyses

In vitro transcribed full-length JFH1 RNA was transfected by electroporation as described [49]. At 40 h post-transfection, cells were analyzed by indirect immunofluorescence and flow cytometry.

Indirect immunofluorescence microscopy

Infected or transfected cells grown on coverslips were fixed with 3% paraformaldehyde and permeabilized with 0.05% Triton X-100 in PBS. Cells were then stained with anti-C mAb ACAP27 followed by Alexa⁴⁸⁸-conjugated goat anti-mouse (Jackson Im-

muno-research). Coverslips were mounted on glass slides using Mowiol, and observed with a Zeiss Axioplan 2 Axiophot 2 equipped with a 20×/1.3 numerical aperture lens. Fluorescent signals were collected with a Princeton cooled charged device using specific fluorescence excitation and emission filters. Images were processed with Adobe Photoshop software.

Production of HCVpp and infection assays

HCVpp were produced as described previously [3,50] with plasmids kindly provided by B. Bartosch and F.L. Cosset (INSERM U412, Lyon, France). For the production of VSVpp, a plasmid encoding the vesicular stomatitis virus glycoprotein G [51] was used. Supernatants containing the pseudotyped particles were harvested 48 h after transfection, filtered through 0.45-µm pore-sized membranes and conserved at 4°C. HCVpp were added to Huh-7 cells seeded the day before in 24-well plates and incubated for 2–3 h at 37°C. The supernatants were then removed and the cells were incubated in DMEM 10% FBS at 37°C. At 48 h post-infection, luciferase assays were performed as indicated by the manufacturer (Promega).

Acknowledgments

We thank Sophana Ung for his excellent technical assistance. We thank Cécile Voisset, Karin Séron and Hann-Shuin Yew for critical reading of the manuscript. We are grateful to J. McKeating, T. Wakita, J-F. Delagneau, F-L. Cosset and C.M. Rice for providing us with reagents.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JD LC. Performed the experiments: FH CW LC VR CM DD AP HD FL. Analyzed the data: LC ER. Contributed reagents/materials/analysis tools: SL JD SC ER. Wrote the paper: SL LC.

References

- Lemon SM, Walker C, Alter MJ, Yi M (2007) Hepatitis C Virus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Fifth ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp 1253–1304.
- Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M (2006) Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* 55: 1350–1359.
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset F-L (2003) Highly infectious hepatitis C pseudo-viruses containing functional E1E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197: 633–642.
- Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, et al. (2003) Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7271–7276.
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, et al. (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309: 623–626.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, et al. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11: 791–796.
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, et al. (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9294–9299.
- Op De Beeck A, Cocquerel L, Dubuisson J (2001) Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 82: 2589–2595.
- Dubuisson J, Helle F, Cocquerel L (2007) Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* in press.
- Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, et al. (2003) Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 278: 41624–41630.
- Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, et al. (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446: 801–805.
- Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, et al. (2007) Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 81: 12465–12471.
- Yang W, Qiu C, Biswas N, Jin J, Watkins SC, et al. (2008) Correlation of the tight junction-like distribution of claudin-1 to the cellular tropism of HCV. *J Biol Chem*.
- Boucheix C, Rubinstein E (2001) Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 58: 1189–1205.
- Levy S, Shoham T (2005) The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 5: 136–148.
- Levy S, Shoham T (2005) Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology* (Bethesda) 20: 218–224.
- Rubinstein E, Le Naour F, Lagaudriere-Gesbert C, Billard M, Conjeaud H, et al. (1996) CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspanin network connected to HLA-DR and VIA integrins. *Eur J Immunol* 26: 2657–2665.
- Charrin S, Le Naour F, Labas V, Billard M, Le Caer JP, et al. (2003) EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J* 373: 409–421.
- Charrin S, Le Naour F, Oualid M, Billard M, Faure G, et al. (2001) The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem* 276: 14329–14337.
- Clark KL, Zeng Z, Langford AL, Bowen SM, Todd SC (2001) PGRL is a major CD81-associated protein on lymphocytes and distinguishes a new family of cell surface proteins. *J Immunol* 167: 5115–5121.
- Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME (2001) EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem* 276: 40545–40554.
- Stipp CS, Orlicky D, Hemler ME (2001) FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9- associated protein. *J Biol Chem* 276: 4853–4862.
- Sala-Valdes M, Ursa A, Charrin S, Rubinstein E, Hemler ME, et al. (2006) EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J Biol Chem* 281: 19665–19675.
- Kolesnikova TV, Stipp CS, Rao RM, Lane WS, Lusinskas FW, et al. (2004) EWI-2 modulates lymphocyte integrin alpha4beta1 functions. *Blood* 103: 3013–3019.
- Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME (2003) EWI-2 regulates alpha3beta1 integrin-dependent cell functions on laminin-5. *J Cell Biol* 163: 1167–1177.
- Zhang XA, Lane WS, Charrin S, Rubinstein E, Liu L (2003) EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res* 63: 2665–2674.
- Cocquerel L, Quinn ER, Flint M, Hadlock KG, Foung SK, et al. (2003) Recognition of native hepatitis C virus E1E2 heterodimers by a human monoclonal antibody. *J Virol* 77: 1604–1609.
- Higginbottom A, Quinn ER, Kuo CC, Flint M, Wilson LH, et al. (2000) Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol* 74: 3642–3649.

29. Kazarov AR, Yang X, Stipp CS, Sehgal B, Hemler ME (2002) An extracellular site on tetraspanin CD151 determines alpha 3 and alpha 6 integrin-dependent cellular morphology. *J Cell Biol* 158: 1299–1309.
30. Yang XH, Kovalenko OV, Kolesnikova TV, Andzelm MM, Rubinstein E, et al. (2006) Contrasting effects of EWI proteins, integrins, and protein palmitoylation on cell surface CD9 organization. *J Biol Chem* 281: 12976–12985.
31. Kapadia SB, Barth H, Baumert T, McKeating JA, Chisari FV (2007) Initiation of Hepatitis C Virus Infection Is Dependent on Cholesterol and Cooperativity between CD81 and Scavenger Receptor B Type I. *J Virol* 81: 374–383.
32. Koutsoudakis G, Herrmann E, Kallis S, Bartenschlager R, Pietschmann T (2007) The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol* 81: 588–598.
33. Molina S, Castet V, Pichard-Garcia L, Wychowski C, Meurs E, et al. (2008) Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol* 82: 569–574.
34. Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, et al. (2004) CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7270–7274.
35. Flint M, von Hahn T, Zhang J, Farquhar M, Jones CT, et al. (2006) Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J Virol* 80: 11331–11342.
36. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, et al. (2006) Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 80: 5308–5320.
37. Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, et al. (2008) The tight junction proteins claudin-1, -6 and -9 are entry cofactors for the Hepatitis C virus. *J Virol*.
38. Bost AG, Venable D, Liu L, Heinz BA (2003) Cytoskeletal requirements for hepatitis C virus (HCV) RNA synthesis in the HCV replicon cell culture system. *J Virol* 77: 4401–4408.
39. Coffey G, Kuo C-C, Levy S. Co-ligation of CD81 and the B-cell receptor by Hepatitis C Virus envelope protein E2 enhances B-cell signaling. In: *Conferences FSR*, ed. 2006; Tucson, AZ, USA.
40. Crotta S, Ronconi V, Ulivieri C, Baldari CT, Valiante NM, et al. (2006) Cytoskeleton rearrangement induced by tetraspanin engagement modulates the activation of T and NK cells. *Eur J Immunol* 36: 919–929.
41. Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J (2006) Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* 87: 1075–1084.
42. Cocquerel L, Kuo CC, Dubuisson J, Levy S (2003) CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers. *J Virol* 77: 10677–10683.
43. Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S (1990) TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol* 10: 4007–4015.
44. Cocquerel L, Meunier JC, Pillez A, Wychowski C, Dubuisson J (1998) A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol* 72: 2183–2191.
45. Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD, Shotton C, Dubuisson J, et al. (1999) Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 73: 6235–6244.
46. Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, et al. (2001) Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* 75: 8240–8250.
47. Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouille Y, et al. (2007) Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* 88: 2495–2503.
48. Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, et al. (2006) Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* 80: 1734–1741.
49. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, et al. (2003) Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125: 1808–1817.
50. Op De Beeck A, Voisset C, Bartosch B, Ciczora Y, Cocquerel L, et al. (2004) Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* 78: 2994–3002.
51. Sandrin V, Boson B, Salmon P, Gay W, Negre D, et al. (2002) Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100: 823–832.

II. Article 2

L'association de CD81 avec les microdomaines enrichis en tétraspanines n'est pas essentielle à l'entrée du Virus de l'Hépatite C

The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C Virus entry

Vera Rocha-Perugini^{1‡}, Muriel Lavie^{1‡§}, David Delgrange¹, Jonathan Canton¹, André Pillez¹, Eric Rubinstein², Jean Dubuisson^{1†}, Czeslaw Wychowski^{1†} and Laurence Cocquerel^{1†*}

¹Institut de Biologie de Lille (UMR8161), CNRS, Universités de Lille I et Lille II, Institut Pasteur de Lille, France.

²INSERM-U602, Institut André-Lwoff, Université Paris XI, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France.

§Present address : DKFZ, Tumorstudiologie, Virus-Produktion und –Entwicklung, Heidelberg, Germany.

Running title: HCV and TEM-associated CD81

* These authors contributed equally to this work

† These senior researchers contributed equally to this work

Correspondence should be addressed to L. C. (laurence.cocquerel@ibl.fr)

Phone: (+33) 3 20 87 11 62 – Fax: (+33) 3 20 87 12 01

ABSTRACT

Although the early steps of Hepatitis C Virus (HCV) entry into hepatocytes have yet to be elucidated, numerous studies have shown a key role of the tetraspanin CD81 in this process. In our study, we describe a human hepatoma Huh-7 cell clone (Huh-7w7) which has lost CD81 expression and can be infected by HCV when human CD81 (hCD81) is ectopically expressed. Interestingly, ectopic expression of mouse CD81 (mCD81) in Huh-7w7 cells was also able to restore HCV permissivity, indicating that mCD81 expressed in human hepatocytes mimics hCD81 in HCV entry and likely in interactions with cellular factors. We then took advantage of these permissive cells expressing mCD81 and the previously described MT81/MT81w mAbs to analyze the role of tetraspanin-enriched microdomains (TEM) associated CD81 in HCV infection. Importantly, MT81w antibody, which only recognizes TEM-associated mCD81, did not inhibit HCV infection. Furthermore, cholesterol depletion, which inhibits HCV infection and reduces total cell surface expression of CD81, did not affect TEM-associated CD81 levels. In addition, sphingomyelinase treatment, which also reduces HCV infection and cell surface expression of total CD81, raised TEM-associated CD81 levels. Altogether, our data indicate that CD81 associated with TEM does not participate in the early steps of HCV life cycle.

INTRODUCTION

Approximately 130 million people are infected worldwide by Hepatitis C Virus (HCV) (Lemon et al., 2007). Almost 80% of infected patients develop a chronic hepatitis that can in the long term evolve either to liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Unfortunately, no vaccine is currently available to prevent new infections and the current treatments are not fully efficient (Takaki et al., 2000). HCV is a small enveloped virus whose positive RNA genome encodes a single polyprotein precursor of about 3000 amino acids. This precursor is co- and post-translationally cleaved by cellular and viral proteases to yield at least 10 mature products, which includes three structural proteins: a core protein (C) and two envelope glycoproteins (E1 and E2) (reviewed in (Lavie et al., 2007)).

Due to the difficulties in propagating HCV in cell culture, several surrogate models have been developed during the past two decades to analyze the different steps of the HCV life cycle. A few years ago, a major step in investigating HCV entry was achieved in the development of pseudotyped particles (HCVpp), consisting of native HCV envelope glycoproteins, E1 and E2, assembled onto retroviral core particles (4, 15, 24). More recently, the development of a cell culture system allowing an efficient amplification of HCV (HCVcc) has also been reported (35, 55, 61). This cell culture system allows the study of the whole life cycle of HCV and, together with HCVpp, also permits the characterization of HCV entry mechanisms.

Although the early steps of viral entry have yet to be elucidated, accumulated data suggest several cell surface-expressed molecules as entry factors for HCV (reviewed in (Dubuisson et al., 2008)). Among these molecules, the tetraspanin CD81 has been shown to play a key role in HCV entry, acting during a post-attachment step (7, 27). HCV entry is strongly reduced in the presence of anti-CD81 antibodies or in CD81 knock-down hepatoma cells (reviewed in (Rocha-Perugini et al., 2008)). Like all members of the tetraspanin family, CD81 is composed of four transmembrane domains, a small extracellular loop (SEL) and a large extracellular loop (LEL), which contains a conserved CCG amino acid motif involved in the formation of disulfide bridges (Boucheix and Rubinstein, 2001). The CD81 LEL is the critical region for the interaction with the E2 envelope glycoprotein and for virus entry. The role of CD81 in the species restriction of HCV has been extensively studied (2, 17, 18, 23, 37, 39), and it has been recently shown that in spite of the absence of *in vitro* interaction between murine CD81 (mCD81) LEL and a soluble form of HCV E2, the ectopic expression of mCD81 in HepG2 cells restored permissivity to HCVpp and, in a lesser extent, to HCVcc (Flint et al., 2006). These results suggest that CD81 contributes to, but alone does not define, the species restriction and additional cellular factors are likely involved. Very recently, we have shown that, EW1-2wint, a new partner of CD81, is able to modulate HCV entry in target cells suggesting that, in addition to the presence of specific entry factors in the hepatocytes, the absence of a specific inhibitor may contribute to the hepatotropism of HCV (Rocha-Perugini et al., 2008).

Members of the tetraspanin family organize and regroup their associated transmembrane proteins and are involved in various functions such as cell morphology, motility, fusion and signalling (9, 34). A major characteristic of tetraspanins is their ability to interact with each other and with other transmembrane proteins, thus building multi-molecular membrane complexes, collectively referred to as the tetraspanin enriched microdomains (TEM) or tetraspanin webs (33, 46). Membrane cholesterol contributes to the organization of these domains on the surface of live cells (49) and it is also critical to many pathogens, including HCV (Kapadia et al., 2007) and Plasmodium (malaria agent) infection (49). Interestingly, it has been shown that CD81 is required for Plasmodium sporozoite entry and differentiation into hepatocytes (50, 51). Using a monoclonal antibody (mAb) that specifically recognizes a subset of mouse CD81 molecules associated with tetraspanin microdomains (MT81w), Silvie et al. showed that cell membrane cholesterol enrichment of mice hepatocytes increased the fraction of TEM-associated CD81 at the cell surface. Moreover, mice hepatocyte infectivity of Plasmodium sporozoites was inhibited by MT81w mAb. These results defined the role of TEM-associated CD81 in mice Plasmodium infection (49). The similarities between Plasmodium and HCV liver infections indicate the importance of studying the role of TEM-associated CD81 in HCV infection.

In our study, infection of Huh-7 target cells with highly infectious HCVcc particles allowed us to isolate a cellular clone resistant to HCV infection which has lost CD81 expression (Huh-7w7 cells). We then took advantage of the emergence of these CD81-deficient cells to analyze the functionality of mCD81 in HCV infection and to study the role of TEM-associated CD81 in HCV infection.

RESULTS

Generation of Huh-7 cells resistant to HCV infection

In a previous study, we have shown that a HCV JFH-1 full-length RNA genome encoding mutations in the capsid and E2 sequences (JFH-1/CS-N6) releases highly infectious HCVcc particles which display a marked cytopathic effect on target cells (Delgrange et al., 2007). Infection of Huh-7 cells with these particles led to the selection of few living cells that were resistant to HCV infection. In order to analyze the capacity of these cells to resist to HCVcc infection, they were amplified and treated with interferon α to eliminate any potential remaining virus. This cell population, called Resistant 1 (R1), displayed reduced levels of JFH-1 HCVcc infection compared to parental Huh-7 cells (Figure 1A). In parallel, we infected the R1 cell population with retroviral particles harboring HCV envelope glycoproteins of genotypes 1a or 2a (HCVpp-1a or HCVpp-2a, respectively) and found reduced levels of HCVpp infection in comparison to Huh-7 cells (Figure 1B). Both cell lines were not infected by particles devoid of envelope proteins (data not shown) and were equally infected with the positive control VSVpp, which infects virtually all type of cells (Figure 1B).

To further analyze this cellular resistance to HCV infection, cellular clones were isolated by limiting dilution and their sensitivity to HCVcc and HCVpp infection was analyzed. As shown in Figure 1C, several clones were resistant to infection (clones 3, 7, 8, 10, 12 and 14) while others exhibited some susceptibility to HCVcc (clones 1, 2, 4, 5, 6 and 16), but greatly reduced when compared to the parental Huh-7 cells. Interestingly, analysis of the sensitivity of several clones to HCVpp infection showed similar reduced infectivity levels (Figure 1D), indicating that the entry step of HCV life cycle is affected in these cells. The only major difference was observed for clone 6, which was barely permissive for JFH-1 infection but highly permissive for HCVpp, suggesting that replication or assembly of HCVcc is likely affected in these cells.

Ectopic expression of human and mouse CD81 in resistant cells restores HCV permissivity

The HCV entry stage is a multistep process involving several cellular factors (reviewed in (Dubuisson et al., 2008)). Among these molecules, the tetraspanin CD81, the

Scavenger Receptor class B type I (SR-BI), and the tight junction protein claudin 1 (CLDN-1) play key roles. Since the absence of one of these molecules might explain the differences in infectivity of the R1 cell clones, expression levels of SR-BI, CD81 and CLDN-1 were examined (Figure 1E). Experiments of surface biotinylation followed by immunoprecipitations with specific mAbs showed that the cell surface expression levels of SR-BI and CLDN-1 were similar in each clone, whereas CD81 expression differed among the clones. CD81 cellular expression levels in R1 cell clones were also tested by anti-CD81 western-blotting over total cell lysates and similar results were obtained (data not shown). Interestingly, non permissive R1 cell clones were also negative for CD81 expression, indicating that HCV entry defect observed in clones 3, 7, 8, 10, 12 and 14 is likely due to the absence of CD81 expression.

To confirm our hypothesis, we ectopically expressed CD81 in one of the non-permissive Huh-7 R1 cell clones (clone 7) that we called Huh-7w7 cells. Plasmids expressing human CD81 (hCD81), mouse CD81 (mCD81) or empty expression vector (pcDNA3.1) were stably transfected in Huh-7w7 cells. The CD81 expression level was next controlled by flow cytometry analysis using 5A6 anti-hCD81 (Figure 2A, left panel) and MT81 anti-mCD81 (Figure 2A, right panel) mAbs. As shown in Figure 2A, hCD81 surface expression in Huh-7w7/hCD81 cells was slightly higher than in parental Huh-7 cells, whereas almost no hCD81 expression was detectable in Huh-7w7/pcDNA3.1 and Huh-7w7/mCD81 cells. The weak staining of hCD81 in Huh-7w7/mCD81 and Huh-7w7/pcDNA3.1 cells suggest the presence of residual hCD81 in Huh-7w7 cells, and/or a cross-reaction of the anti-hCD81 mAb with mCD81. mCD81 was also highly expressed in Huh-7w7/mCD81 cells (Figure 2A, right panel) and expression level was comparable with the one of Hepa1.6 cells that naturally express mouse CD81 (data not shown). Huh-7 cells and the complemented Huh-7w7 populations displayed similar expression levels of the control tetraspanin CD151 (data not shown).

We next tested the sensitivity of Huh-7w7/hCD81, Huh-7w7/mCD81 and Huh-7w7/pcDNA3.1 cells to HCVcc and HCVpp infection. As shown in Figure 2B, the level of infectivity of Huh-7w7/hCD81 cells was 50%, as compared to the one of Huh-7 cells, indicating that despite being highly expressed, hCD81 did not fully restore permissivity to HCVcc. Possible differences in stoichiometry and/or oligomerization of hCD81 might affect HCVcc entry in these cells. Huh-7w7 cells did not display any difference in HCV replication as compared to Huh-7 cells (data not shown). In contrast, ectopic expression of hCD81 fully restored permissivity to HCVpp harboring HCV envelope glycoproteins from different genotypes (Figure 2C).

Interestingly, ectopic expression of mCD81 in Huh-7w7 cells was also able to restore HCV permissivity. As shown in Figure 2B, the level of permissivity to HCVcc of Huh-7w7/mCD81 cells was 20 % of the one of parental Huh-7 cells. In addition, permissivity of Huh-7w7/mCD81 cells to HCVpp bearing glycoproteins from different genotypes was

analyzed and showed that mCD81 supports infection with HCVpp from genotypes 2a and 4, with 29% and 19% of level of infectivity respectively, as compared to the one of Huh-7 cells (Figure 2C). In contrast to Flint et al. (Flint et al., 2006), we did not observe any significant infectivity for HCVpp harboring glycoproteins from genotypes 1a and 1b. It is worth noting that the sensitivity of Huh-7w7/mCD81 cells to HCV infection is solely due to the expression of mCD81 since anti-hCD81 mAbs (1.3.3.2.2 and 5A6) efficiently inhibited HCVcc and HCVpp-2a infection of Huh-7 and Huh-7w7/hCD81 cells, but did not significantly affect the infectivity of Huh-7w7/mCD81 cells (Figure 3 and data not shown).

Taken together, these data indicate that HCV infection is directly related to CD81 expression in Huh-7w7 cells. Most importantly, mCD81 in the context of such human hepatocytes is able to some extent to mimic the role of hCD81 in HCV entry and likely interacts in a similar way with cellular factors.

Role of TEM-associated CD81 in HCV entry

Tetraspanins associate extensively with each other and other membrane proteins to form the TEMs. Recently, Silvie et al. have described the MT81w mAb, which specifically recognizes mouse CD81 associated with other tetraspanins. This is evidenced by the lack of recognition of CD81 after cell lysis with detergents that do not preserve tetraspanin-tetraspanin interactions, and by the complete removal of the CD81 pool recognized by MT81w following immunodepletion of tetraspanin complexes (49). CD81 is required for invasion of hepatocytes by sporozoites of human malaria *Plasmodium falciparum* and rodent malaria *Plasmodium yoelii* parasites (51). Using MT81w antibody, Silvie et al. have shown that the subset of CD81 associated with TEMs contributes to *Plasmodium* sporozoite infection (49). Such an antibody preferentially recognizing human CD81 associated with TEMs is not available. However, since Huh-7w7/mCD81 cells are susceptible to HCVcc and HCVpp-2a infection, we next took advantage of this model and the MT81w mAb to study the role of TEM-associated CD81 in the early steps of HCV life cycle.

Using the MT81w anti-mCD81 mAb, we first characterized the subpopulation of mCD81 that is associated with TEMs on the cell surface of Huh-7w7/mCD81 cells (Figure 4A). As shown by flow cytometry analysis, the intensity of MT81w labeling only reached $32\pm 14\%$, depending on the experiment, of the intensity with MT81 in Huh-7w7/mCD81 cells, indicating that only a fraction of CD81 molecules is engaged in tetraspanin microdomains on these cells. The specificity of this mAb to recognize TEM-associated CD81 in Huh-7w7/mCD81 cells was confirmed by immunoprecipitation experiments from cell lysates made under different detergent conditions (data not shown), as previously described (49).

We then analyzed the ability of MT81 and MT81w to inhibit HCVcc and HCVpp-2a infectivity. As shown in Figures 4B and 4C, MT81 mAb, which recognizes the whole

population of CD81, efficiently inhibited both HCVcc infection and HCVpp-2a entry into Huh-7w7/mCD81. Indeed, MT81 inhibited 80% of HCVcc infection and 95% of HCVpp-2a infection at low concentrations (3 μ g/ml). In contrast, MT81w was poorly neutralizing since it only induced an inhibition of 40% and 60% of HCVcc and HCVpp-2a infection, respectively, at tenfold higher concentrations (30 mg/ml). However, it has to be noted that MT81w mAb might be a low-affinity antibody, as compared to MT81 (49). The specificity of the observed inhibitory effect was ensured by using an irrelevant antibody (anti-transferrin receptor antibody CD71) during infection. This mAb had no effect on HCV infectivity levels even at high concentrations (data not shown). As expected, MT81 and MT81w did not affect HCVcc or HCVpp-2a infectivity levels of Huh-7 cells (data not shown).

Together, our results suggest that TEM-associated CD81 molecules likely do not play a central role in HCV entry. However, since we cannot exclude a partial recognition of TEM-associated CD81 molecules by MT81w or that the epitope recognized by this antibody is located outside of the E2 binding region, we further analyzed the role of TEM-associated CD81 in HCV entry using other approaches.

Role of cholesterol in HCV infection and the association of CD81 with TEM

Cellular cholesterol has been shown to modulate the organization of tetraspanin microdomains (49) and to be involved in HCV life cycle (Ye, 2007). To further analyze the role of TEM-associated CD81 in HCV infection, we next assessed the effect of cholesterol depletion on HCV infection. Huh-7w7/mCD81 cells were treated with increasing amounts of methyl-beta-cyclodextrin (M β CD), a cyclic oligosaccharide that selectively removes cholesterol from the plasma membrane without incorporating into the membrane (Yancey et al., 1996). Treatment of Huh-7w7/mCD81 cells with M β CD prior to infection resulted in a dose-dependent inhibition of HCVcc (Figure 5A) and HCVpp-2a (Figure 5B) infectivity. In both set of experiments the maximal inhibition of HCV infection was reached at an M β CD concentration of 15mM, which decreased the cellular cholesterol content by fivefold (data not shown). Moreover, inhibition of infection was specifically due to cholesterol removal from the cell surface, since it was reversed by cholesterol replenishment with M β CD-cholesterol complexes before HCV infection (Figures 5C and 5D). Such preformed M β CD-cholesterol complexes are known to replenish cells with cholesterol (Christian et al., 1997). It has to be noted that M β CD treatment had no effect on VSVpp entry (Figure 5D), which is clathrin dependent, indicating that HCVpp-2a entry inhibition was not due to disruption of clathrin-enriched domains following cholesterol depletion (28, 44, 52). In addition, cell treatment with M β CD at 15mM three hours after cell/virus contact did not have any effect on infection (data not shown), indicating that membrane cholesterol is required at the entry step and M β CD is not toxic under our experimental conditions. Cholesterol depletion and replenishment

experiments were performed on Huh-7 cells and gave similar results (Figure 6A). Altogether, these data confirm the role of cholesterol in HCV entry and bring to light a similar response of Huh-7w7/mCD81 and Huh-7 cells to cholesterol depletion and replenishment in terms of HCV infection.

We next analyzed surface expression of CD81 and its association with TEMs in cells treated with M β CD or M β CD-cholesterol complexes. CD81 expression of Huh-7w7/mCD81 and Huh-7 cells treated with M β CD, with M β CD-cholesterol or with both compounds, was analyzed by flow cytometry (Figures 6B and 7), and expression of CD151, another tetraspanin, was used as a control (Figures 6B and 7, right panels). Cholesterol depletion by M β CD treatment had no significant specific effect on the expression of CD81 in Huh-7 cells, as determined with the anti-hCD81 5A6 mAb (Figure 6B). Thus, the inhibitory effect of M β CD on HCV infection observed in Huh-7 cells is unlikely due to a decrease of CD81 expression at the cell surface. In contrast, M β CD treatment of Huh-7w7/mCD81 cells reduced MT81 labeling by $58\pm 7\%$ (Figure 7Aa), suggesting that cholesterol depletion induced a decrease in total cell surface expression of mCD81 in Huh-7w7/mCD81 cells. Even with cholesterol replenishment, CD81 expression level could not be restored to conditions that would enable HCV infectivity (Figure 7Ac, M β CD+Chol). Incubation of M β CD-treated cells with increasing concentrations of preformed M β CD-cholesterol complexes raised cell surface mCD81 expression level (Figure 7B). However, a concentration four times higher than needed to reverse the inhibitory effect of M β CD on HCV infectivity (10mM instead of 2,5mM) was necessary to reach the cell surface mCD81 expression level of untreated cells. Interestingly, treatment with M β CD alone had no effect on TEM-associated mCD81 population in Huh-7w7/mCD81 cells, as determined using MT81w (Figure 7Ab). Conversely, cholesterol enrichment of non depleted cells with preformed M β CD-cholesterol complexes led to a 2 ± 0.6 fold increase of TEM-associated mCD81 population (Figure 7Af), without any change in the total CD81 population (Figure 7Ae). These results confirm the role of cholesterol in TEM organization. Expression of CD151 under different conditions was not affected (Figure 7A, right panels).

In conclusion, cellular cholesterol depletion mediated by M β CD strongly affects HCV infection, but it has no effect on TEM-associated mCD81 in Huh-7w7/mCD81 cells. Again, these data do not support a key role for TEM-associated CD81 molecules in HCV infection.

Role of ceramide in TEM-associated CD81 and in HCV infection

Beyond cholesterol, sphingolipids are also known to be important for the organization of the plasma membrane. Among them, sphingomyelin can be converted into ceramide by sphingomyelinase (Smase), and increasing ceramide concentration can lead to lipid microdomain reorganization (Bollinger et al., 2005). We have previously reported that

ceramide enrichment of the plasma membrane following sphingomyelin hydrolysis by sphingomyelinase strongly inhibits HCV entry and reduces CD81 cell surface expression level by 50% (Voisset et al., 2008). Since sphingomyelin influences CD81 cell surface expression as well as HCV infection, we sought to determine the effect of the Smase treatment on TEM-associated CD81 population. Cells were pre-treated with Smase, washed and then infected with HCVcc or HCVpp-2a. Similarly to Huh-7 cells (Figure 8A), Huh-7w7/mCD81 were affected by Smase treatment, resulting in 70-80% and 50-60% inhibition of HCVcc and HCVpp-2a infection, respectively (Figure 9A).

In order to determine whether these inhibitions were associated with changes in cell surface expression of CD81, we analyzed by flow cytometry the CD81 surface expression level of Huh-7w7/mCD81 and Huh-7 cells after Smase treatment (Figures 8B and 9B). Smase treatment resulted in a significant decrease ($32\pm 2\%$) of cell surface expression of CD81 on Huh-7 cells (Figure 8B), as previously described (Voisset et al., 2008). Interestingly, Smase treatment of Huh-7w7/mCD81 led to a significant reduction ($52\pm 18\%$) in MT81 labeling and conversely to significant increase ($277\pm 74\%$) in MT81w labeling (Figure 9B), indicating that the treatment induced a reduction of total mCD81 expression and an increased association of CD81 with TEM. As expected, Smase treatment did not affect the expression of the control tetraspanin CD151 (Figure 9B, right panel).

Thus, Smase treatment of Huh-7w7/mCD81 cells resulted in HCV entry inhibition and increase of TEM-associated mCD81 population. In agreement with previous data, these results indicate that TEM-associated CD81 does not play a major role in HCV entry. Moreover, the similarity of Huh-7 and Huh-7w7/mCD81 cells responses to Smase treatment tends to show that results obtained with Huh-7w7/mCD81 cells can be extrapolated to Huh-7 cells.

DISCUSSION

We have previously shown that mutations (CS-N6) in the structural proteins of the JFH-1 genome increase the production and infectivity of HCVcc particles, leading to an accelerated cytopathic effect (Delgrange et al., 2007). Interestingly, infection of Huh-7 cells with such particles led us to isolate a cellular population, called R1, resistant to HCV infection. We generated several Huh-7 R1 clones selected by limiting dilution cloning and found them to exhibit different levels of permissivity to HCVcc and HCVpp. For most of the clones, reduced HCVcc and HCVpp infection levels were directly related to their reduced expression level of CD81, while other entry molecules such as SR-BI and CLDN-1 were not modified. Ectopic expression of CD81 in Huh-7w7 cells, one of the resistant cell clones, restored HCV permissivity indicating that CD81 deficiency alone was responsible for the resistance to HCV infection in these cells. In agreement with previous studies (1, 26, 47), we

did not observe any variation in HCV genome replication in Huh-7w7 cells in comparison to Huh-7 cells (data not shown), suggesting that CD81 is not involved in this step of the viral cycle. Masciopinto et al. showed that CD81 and HCV envelope glycoproteins could be detected in exosomes of mammalian cells, suggesting that HCV may intracellularly interact with CD81 allowing its export (38). They pointed out a possible role of CD81 in assembly and release of HCV particles. However, our results indicate that CD81 does not participate to HCV assembly or release of new viral particles, since the supernatant of Huh-7w7 cells transfected with full-length HCV RNA infected naïve Huh-7 cells to a level comparable to that of the supernatant from transfected Huh-7 cells. Thus, Huh-7w7 cells constitute a new tool allowing to investigate the involvement of CD81 in HCV entry and offering a new single-cycle replication system.

The molecular determinants of HCV-CD81 interaction have been analyzed by several groups by using biochemical assays (reviewed in (Rocha-Perugini et al., 2008)). However, Flint et al have recently highlighted the limitation of these approaches since various mutated CD81 sequences previously reported to abrogate E2-CD81 interaction, were able to restore permissivity in HepG2 cells (Flint et al., 2006). In our study, we show that ectopic expression of human and mouse CD81 proteins in human hepatoma cells devoid of CD81 conferred susceptibility to infection by HCVcc and HCVpp at various levels. Interestingly, mCD81 protein supports infection by HCVcc and HCVpp bearing glycoproteins from genotypes 2a and 4 suggesting that, in accordance with other studies (18, 37), CD81 is not the sole determinant of species susceptibility to HCV. Other additional cellular factors likely modulate HCV entry. In addition, interaction/organization levels and stoichiometry between entry factors and plasma membrane lipids may regulate species susceptibility to HCV.

CD81 belongs to the tetraspanin family of which members have the distinctive feature of clustering dynamically with numerous partner proteins and with one another in membrane microdomains. Within this web, the associations of tetraspanins with their nontetraspanin partner molecules have been referred to as primary, and tetraspanin can interact with each other through their associated partner (Boucheix and Rubinstein, 2001). In contrast to primary complexes, tetraspanin-tetraspanin interactions are not stoichiometric and palmitoylation is necessary for the maintenance of these interactions (6, 11, 58, 59). It is still unknown whether all tetraspanins expressed in a certain cell are associated with each other. Importantly, tetraspanins associate indirectly with additional proteins. Functionally, these interactions cluster in TEM, enabling lateral dynamic organization in the membrane and the cross-talk with intracellular signalling and cytoskeletal structures (Levy and Shoham, 2005a). In our study, generation of a human cell line expressing mCD81 (Huh-7w7/mCD81 cells) permissive to HCV infection allowed us to analyze the role of TEM-associated CD81 in HCV infection. This study could be performed with two recently described mAbs: MT81, which

recognizes total mCD81; and MT81w, which specifically recognizes a fraction of mCD81 associated with other tetraspanins (49). It is worth noting that such a tool allowing the detection of hCD81 associated with TEMs is not available. We first determined the inhibitory effect of both mAbs on HCVcc and HCVpp infection: MT81 strongly inhibited HCV infection, whereas MT81w led to a weak inhibition of infection at saturating concentrations. This reduced capacity of MT81w mAb to inhibit HCV infection suggests that TEM-associated CD81 molecules, recognized by this mAb, are not the exclusive site of infection. In accordance with these results, ceramide enrichment of plasma membrane leading to an increased association of CD81 with TEMs highly inhibits HCV infection. While palmitoylation is not the only mechanism by which tetraspanins interact with each other, it has been shown to play an essential role in TEM organization (6, 11, 58, 59). The ability of palmitoylation-defective CD81 to support infection by HCVpp (Bertaux and Dragic, 2006) is again consistent with a minor role of TEM-associated CD81 in HCV entry. We cannot exclude that the epitope recognized by MT81w mAb on CD81 is not involved in HCV interaction. The partial inhibition of MT81w might also be the reflect of a partial recognition of the TEM-associated CD81 fraction, as previously suggested by Silvie et al. (49).

The entire HCV life cycle is associated with cholesterol metabolism in host cells (reviewed in (Ye, 2007)), and lipid composition of the plasma membrane seems very important for the HCV entry step. In our study, we showed that cholesterol depletion by treatment with M β CD strongly reduced HCV entry into target cells, and conversely cholesterol replenishment by M β CD-cholesterol complexes restored the infection levels. Interestingly, we found that M β CD treatment reduced CD81 expression level on Huh-7w7/mCD81 whereas it had no effect on CD81 expressed in Huh-7 cells. In contrast with Kapadia et al. (Kapadia et al., 2007), these data suggest that the inhibitory effect of M β CD on HCV infection is not necessarily due to a decrease in CD81 expression at the cell surface. These results point out again the importance of cell membrane cholesterol in HCV entry, likely in the fusion process as has been previously suggested (Lavillette et al., 2006). Very recently, we have shown that increasing the levels of ceramide in the plasma membrane induce a massive endocytosis of CD81 leading to a strong inhibition of HCV infection (Voisset et al., 2008). Interestingly, in the present study, we showed that following Smase treatment of Huh-7w7/mCD81 cells, expression of CD81 is inversely related to association of CD81 with tetraspanin webs. These results suggest that ceramide might specifically modify the levels of interaction or the cell surface distribution of TEM. In this regard, it has been shown that gangliosides play an important role in the organization of CD82-enriched microdomains (Odintsova et al., 2006). Ceramide enrichment may also induce clustering of CD81 leading to an increased binding of MT81w mAb. In accordance with this hypothesis, it

has been shown that high levels of ceramide induce large-scale clustering/capping of death receptors (e.g. Fas/CD95) required to initiate efficient formation of death-induced signalling complex (13, 20). Alternatively, MT81w may recognize an epitope of CD81 that is more exposed following ceramide enrichment. Further analyses are necessary to evaluate these hypotheses.

HCV and malaria agent Plasmodium are two major pathogens targeting the liver. Both use the glycosaminoglycans for their initial attachment on the surface membrane of hepatocytes (3, 5, 19, 27, 40, 43), and CD81 is required for their life cycle. Indeed, CD81 is required for invasion of hepatocytes by sporozoites of human malaria *P. falciparum* and rodent malaria *P. yoelii* parasites (51). Antibodies to CD81 or CD81 silencing strongly reduce the infection of hepatic cells and CD81-deficient mouse hepatocytes are resistant to infection by *P. falciparum* and *P. yoelii*. Using CD81/CD9 chimeras, it has been recently shown that CD81 LEL plays a critical role in sporozoite infection and a stretch of 21 amino acids is sufficient to confer susceptibility to infection (56). In contrast to HCV infection, it seems that CD81 does not act directly as a receptor but is rather involved indirectly, likely by modulating the activity of an associated protein. This hypothesis is supported by the fact that CD81 associated to multiple proteins in the tetraspanin web plays a major role in sporozoite infection, since modulation of cellular cholesterol levels, which changes tetraspanin microdomain organization, has been shown to also modify the extent of CD81-dependent sporozoite infection (49). In contrast, in our study, we demonstrated that TEM-associated CD81 is not used by HCV, indicating that these two pathogens, while using the same molecules, invade their host by different mechanisms.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies

5A6 (anti-CD81 kindly provided by S. Levy); ACAP27 (anti-HCV core, kindly provided by JF Delagneau); MT81 (anti-CD81), MT81w (anti-TEM associated CD81) and TS151 (anti-CD151) mAbs were used in this study. The anti-Claudin-1 (JAY.8) was from Zymed, the anti-SR-BI (NB400-104H3) was from Novus, the anti-transferrin receptor antibody was from Biolegend (Ozyme) and the anti-hCD81 (1.3.3.22) was from Santa Cruz Biotechnology.

Production of HCVcc and infection assays

The plasmid pJFH1, containing the full-length cDNA of JFH-1 isolate (kindly provided by T. Wakita, National Institute of Infectious Diseases, Japan), was used to generate HCVcc as described (14, 55). Infectious titers of viral stocks were estimated to be between 10⁵ and 10⁶ infectious units per ml, based on immunofluorescent detection of infected foci following infection of Huh-7 cells with serial dilutions of viral stocks. Cells were incubated with HCVcc

(m.o.i.=1) for 2h at 37°C, washed and incubated for additional 48h at 37°C. Infections were measured by indirect immunofluorescence with anti-C mAb ACAP27 followed by Alexa488-conjugated goat anti-mouse (Jackson Immunoresearch). Coverslips were observed with a Zeiss Axioplan 2 Axiophot 2 equipped with 20X/1.3 numerical aperture lens. Fluorescent signals were collected with Princeton cooled charged device using specific fluorescence excitation and emission filters.

To generate HCVcc expressing Renilla luciferase, we used the FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi genome (Tscherne et al., 2006) kindly provided by C.M. Rice (The Rockefeller University, New York). We replaced the region encoding the J6/JFH-1 HCV polyprotein with the CS-N6 JFH-1 sequence (Delgrange et al., 2007). HCVcc were produced as previously described (14, 53, 55). HCVcc were added to Huh-7 cells seeded the day before in 24-well plates and incubated for 2 h at 37°C. The supernatants were then removed and the cells were incubated in DMEM 10% FBS at 37°C. At 40-48 h post-infection, Renilla luciferase assays were performed as indicated by the manufacturer (Promega).

Generation of R1 cell population and resistant cellular clones

Huh-7 cells seeded in a 25 cm² flask were infected (m.o.i.=1) with JFH-1/I2/CS-N6 particles (Delgrange et al., 2007) 4h at 37°C. Three days post-infection, cells were transferred to a 75-cm² flask, and medium was replaced every five days. Cell cultures were maintained for several weeks. Survival cells were then pooled and grown in 25 cm² flask. These cells resistant to HCV infection, called the R1 cell population, were then treated with IFN α at a final concentration of 200 UI/ml. Cell passages were performed approximately every 5 days. After six successive treatments with IFN α cells were analysed by immunofluorescence and western blotting and subcloned by limiting dilution. The cells were seeded in 96-well plates at 1 cell/well in DMEM 10%SVF. Individual cell clones were amplified and subculture passages were performed every 5 days. Cellular clones were named Huh-7w with a number corresponding to the clone.

Cell transfection

Huh-7w7 cells were transfected using ExGen500 (Eurogentec) with plasmids expressing human CD81 (pcDNA3.1/hCD81), murine CD81 (pcDNA3.1/mCD81) (10) or the empty vector. Polyclonal populations were obtained by selection for 4 weeks with 600 μ g/ml of Neomycin (Invitrogen).

Antibody neutralization assay

Neutralization assays were performed by co-incubating HCVcc/HCVpp and antibodies with target cells 3h at 37°C. Cells were further incubated for 48h with DMEM 10% FCS before measuring the luciferase activities as indicated by the manufacturer (Promega).

Cholesterol depletion/replenishment

Cholesterol depletion was carried out by incubating cells with different concentrations of methyl- β -cyclodextrin (M β CD, Sigma) in serum-free medium at 37°C for 20 min. Cholesterol replenishment of cholesterol-depleted cells was achieved by incubating cells with 1:10 (mol/mol) complex of cholesterol and M β CD (cholesterol water soluble, Sigma) using a 2.5 mM final cholesterol concentration in serum-free medium at 37°C for 15 min. Cholesterol levels in M β CD-treated cells were determined using Amplex Red Cholesterol Assay kit (Molecular Probes).

Sphingomyelinase (Smase) treatment

Lipoprotein-depleted serum (LPDS, density>1.25 g/ml) from fetal bovine serum was isolated by KBr density gradient ultracentrifugation as previously described (Hatch, 1968). Smase from *Staphylococcus aureus* was purchased from Sigma. To induce cell-surface ceramide accumulation, cells were incubated with 0.5U/ml of Smase for 30 min at 37°C in DMEM containing 2% LPDS. Smase was washed off and treated cells were infected with HCVcc or HCVpp for 30 min in medium containing 2% LPDS.

Production of HCVpp and infection assays

HCVpp were produced as described previously (Bartosch et al., 2003b; Op De Beeck et al., 2004) with plasmids kindly provided by B. Bartosch and F.L. Cosset (INSERM U412, Lyon, France). The plasmids encoding HCV envelope glycoproteins of genotypes 1b (UKN1B-5.23), 2b (UKN2B-1.1), 3a (UKN3A-1.28) and 4 (UKN4-11.1) were kindly provided by J. Ball (Nottingham University, UK) (Lavillette et al., 2005b). The genotype 1a plasmid (strain H) has been described previously (Bartosch et al., 2003b) and the genotype 2a plasmid (strain JFH-1) was kindly provided by T. Pietschmann and R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany). Plasmids encoding the vesicular stomatitis virus glycoprotein G and feline endogenous virus RD114 glycoprotein (Sandrin et al., 2002) were used for the production of VSVpp and RD114pp, respectively. In cholesterol depletion and Smase experiments, particles were produced in DMEM containing 2% LPDS. Supernatants containing the pseudotyped particles were harvested 48h after transfection, filtered through 0.45- μ m pore-sized membranes and conserved at 4°C. HCVpp were added to cells seeded the day before in 24-well plates and incubated for 2-3h at 37°C. The supernatants were then removed and the cells were incubated in DMEM 10% FBS at 37°C. At 48h post-infection, luciferase assays were performed as indicated by the manufacturer (Promega). Luciferase activities were recorded with a luminometer (LB960, Berthold Technologies).

Detection of cell surface biotinylated proteins

Cells were biotinylated with 0.2mg/mL EZ-link-Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce) in Hanks buffered saline solution (Invitrogen) for 30 minutes at 4°C. After 3 rinses with PBS 0.6% Bovine Serum Albumin (BSA, Euromedex), cells were lysed in 1% Triton X-100 in D-PBS with 2mM EDTA containing protease inhibitors (Complete, Roche). Lysates were precleared for 2h at 4°C with protein A-sepharose (Amersham Biosciences), then incubated for 2h at 4°C with specific mAbs pre-adsorbed onto rabbit anti-mouse-protein A-sepharose beads. After rinsing with the lysis buffer, complexes were eluted with non-reducing Laemmli buffer, resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with peroxidase-conjugated NeutrAvidin (Pierce).

Flow cytometry analysis

The labeling was performed on cells seeded the day before in 24-well plates. Cells were rinsed with PBS 2% Bovin Serum Albumin (PBS/BSA) and incubated for 1h at 4°C with anti-human CD81 (5A6), anti-murine CD81 (MT81, MT81w) or anti-human CD151 (TS151) mAbs. After rinsing with PBS/BSA, cells were stained with phycoerythrin (PE) labeled goat anti-mouse (BD Pharmingen) for 45 min at 4°C. After rinsing, cells were detached with PBS 2mM EDTA and fixed with Formalin Solution (Sigma). Cells stained only with the secondary antibodies were used as negative control. Labelled cells were analyzed using a FACS Beckman EPICS-XL MCL.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sophana Ung for his excellent technical assistance. We thank Birke A. Tews, Kevin Friede and François Helle for critical reading of the manuscript. We are grateful to S. Levy, T. Wakita, J-F. Delagneau, F-L. Cosset, B. Bartosch, R. Bartenschlager, T. Pietschmann, J. Ball and C.M. Rice for providing us with reagents. We thank the Microscopy-Imaging-Cytometry Platform of the Lille Pasteur Campus for access to the instruments and technical advice. This work was supported by the “Institut Fédératif de Recherche–142” (IFR142) and by grants from the CNRS and the “Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales” ANRS. V R-P was supported by a fellowship from the “Institut Pasteur de Lille / Région Nord Pas-de-Calais”. ML and DD were supported by a fellowship from the ANRS. JC was supported by the Pasteur Institute of Lille and the University of Florida. JD is an international scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

REFERENCES

1. **Akazawa, D., T. Date, K. Morikawa, A. Murayama, M. Miyamoto, M. Kaga, H. Barth, T. F. Baumert, J. Dubuisson, and T. Wakita.** 2007. CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *J Virol* **81**:5036-45.
2. **Allander, T., X. Forns, S. U. Emerson, R. H. Purcell, and J. Bukh.** 2000. Hepatitis C virus envelope protein E2 binds to CD81 of tamarins. *Virology* **277**:358-67.
3. **Barth, H., E. K. Schnober, F. Zhang, R. J. Linhardt, E. Depla, B. Boson, F. L. Cosset, A. H. Patel, H. E. Blum, and T. F. Baumert.** 2006. Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* **80**:10579-90.
4. **Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.-L. Cosset.** 2003. Highly infectious hepatitis C pseudoviruses containing functional E1E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **197**:633-642.
5. **Basu, A., T. Kanda, A. Beyene, K. Saito, K. Meyer, and R. Ray.** 2007. Sulfated homologues of heparin inhibit hepatitis C virus entry into mammalian cells. *J Virol* **81**:3933-41.
6. **Berditchevski, F., E. Odintsova, S. Sawada, and E. Gilbert.** 2002. Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem* **277**:36991-7000.
7. **Bertaux, C., and T. Dragic.** 2006. Different domains of CD81 mediate distinct stages of hepatitis C virus pseudoparticle entry. *J Virol* **80**:4940-8.
8. **Bollinger, C. R., V. Teichgraber, and E. Gulbins.** 2005. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta* **1746**:284-94.
9. **Boucheix, C., and E. Rubinstein.** 2001. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* **58**:1189-205.
10. **Charrin, S., F. Le Naour, V. Labas, M. Billard, J. P. Le Caer, J. F. Emile, M. A. Petit, C. Boucheix, and E. Rubinstein.** 2003. EW1-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J* **373**:409-21.
11. **Charrin, S., S. Manie, M. Oualid, M. Billard, C. Boucheix, and E. Rubinstein.** 2002. Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett* **516**:139-44.
12. **Christian, A. E., M. P. Haynes, M. C. Phillips, and G. H. Rothblat.** 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* **38**:2264-72.
13. **Cremesti, A., F. Paris, H. Grassme, N. Holler, J. Tschopp, Z. Fuks, E. Gulbins, and R. Kolesnick.** 2001. Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem* **276**:23954-61.
14. **Delgrange, D., A. Pillez, S. Castelain, L. Cocquerel, Y. Rouille, J. Dubuisson, T. Wakita, G. Duverlie, and C. Wychowski.** 2007. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* **88**:2495-503.
15. **Drummer, H. E., A. Maerz, and P. Pombourios.** 2003. Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett* **546**:385-90.
16. **Dubuisson, J., F. Helle, and L. Cocquerel.** 2008. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* **10**:821-7.
17. **Flint, M., C. Maidens, L. D. Loomis-Price, C. Shotton, J. Dubuisson, P. Monk, A. Higginbottom, S. Levy, and J. A. McKeating.** 1999. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* **73**:6235-44.
18. **Flint, M., T. von Hahn, J. Zhang, M. Farquhar, C. T. Jones, P. Balfe, C. M. Rice, and J. A. McKeating.** 2006. Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J Virol* **80**:11331-42.
19. **Frevert, U., P. Sinnis, C. Cerami, W. Shreffler, B. Takacs, and V. Nussenzweig.** 1993. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med* **177**:1287-98.
20. **Grassme, H., A. Cremesti, R. Kolesnick, and E. Gulbins.** 2003. Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* **22**:5457-70.
21. **Hatch, F. T.** 1968. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv Lipid Res* **6**:1-68.
22. **Helle, F., and J. Dubuisson.** 2008. Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci* **65**:100-12.
23. **Higginbottom, A., E. R. Quinn, C. C. Kuo, M. Flint, L. H. Wilson, E. Bianchi, A. Nicosia, P. N. Monk, J. A. McKeating, and S. Levy.** 2000. Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol* **74**:3642-9.

24. **Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C. M. Rice, and J. A. McKeating.** 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:7271-6.
25. **Kapadia, S. B., H. Barth, T. Baumert, J. A. McKeating, and F. V. Chisari.** 2007. Initiation of Hepatitis C Virus Infection Is Dependent on Cholesterol and Cooperativity between CD81 and Scavenger Receptor B Type I. *J Virol* **81**:374-83.
26. **Koutsoudakis, G., E. Herrmann, S. Kallis, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann.** 2007. The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol* **81**:588-98.
27. **Koutsoudakis, G., A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager.** 2006. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* **80**:5308-20.
28. **Laude, A. J., and I. A. Prior.** 2004. Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol* **21**:193-205.
29. **Lavie, M., A. Goffard, and J. Dubuisson.** 2007. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr Issues Mol Biol* **9**:71-86.
30. **Lavillette, D., B. Bartosch, D. Nourrisson, G. Verney, F. L. Cosset, F. Penin, and E. I. Pecheur.** 2006. Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* **281**:3909-17.
31. **Lavillette, D., A. W. Tarr, C. Voisset, P. Donot, B. Bartosch, C. Bain, A. H. Patel, J. Dubuisson, J. K. Ball, and F. L. Cosset.** 2005. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* **41**:265-74.
32. **Lemon, S. M., C. Walker, M. J. Alter, and M. Yi.** 2007. Hepatitis C Virus, p. 1253-1304. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, Fifth ed, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
33. **Levy, S., and T. Shoham.** 2005. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)* **20**:218-24.
34. **Levy, S., and T. Shoham.** 2005. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* **5**:136-48.
35. **Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, and C. M. Rice.** 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**:623-6.
36. **Manns, M. P., H. Wedemeyer, and M. Cornberg.** 2006. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* **55**:1350-9.
37. **Masciopinto, F., G. Freer, V. L. Burgio, S. Levy, L. Galli-Stampino, M. Bendinelli, M. Houghton, S. Abrignani, and Y. Uematsu.** 2002. Expression of human CD81 in transgenic mice does not confer susceptibility to hepatitis C virus infection. *Virology* **304**:187-96.
38. **Masciopinto, F., C. Giovani, S. Campagnoli, L. Galli-Stampino, P. Colombatto, M. Brunetto, T. S. Yen, M. Houghton, P. Pileri, and S. Abrignani.** 2004. Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur J Immunol* **34**:2834-42.
39. **Meola, A., A. Sbardellati, B. Bruni Ercole, M. Cerretani, M. Pezzanera, A. Ceccacci, A. Vitelli, S. Levy, A. Nicosia, C. Traboni, J. McKeating, and E. Scarselli.** 2000. Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection. *J Virol* **74**:5933-8.
40. **Morikawa, K., Z. Zhao, T. Date, M. Miyamoto, A. Murayama, D. Akazawa, J. Tanabe, S. Sone, and T. Wakita.** 2007. The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol* **79**:714-23.
41. **Odintsova, E., T. D. Butters, E. Monti, H. Sprong, G. van Meer, and F. Berditchevski.** 2006. Gangliosides play an important role in the organization of CD82-enriched microdomains. *Biochem J* **400**:315-25.
42. **Op De Beeck, A., C. Voisset, B. Bartosch, Y. Ciczora, L. Cocquerel, Z. Keck, S. Foug, F. L. Cosset, and J. Dubuisson.** 2004. Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* **78**:2994-3002.
43. **Pancake, S. J., G. D. Holt, S. Mellouk, and S. L. Hoffman.** 1992. Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. *J Cell Biol* **117**:1351-7.
44. **Pichler, H., and H. Riezman.** 2004. Where sterols are required for endocytosis. *Biochim Biophys Acta* **1666**:51-61.
45. **Rocha-Perugini, V., C. Montpellier, D. Delgrange, C. Wychowski, F. Helle, A. Pillez, H. Drobecq, F. Le Naour, S. Charrin, S. Levy, E. Rubinstein, J. Dubuisson, and L.**

- Cocquerel.** 2008. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* **3**:e1866.
46. **Rubinstein, E., F. Le Naour, C. Lagaudriere-Gesbert, M. Billard, H. Conjeaud, and C. Boucheix.** 1996. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol* **26**:2657-65.
47. **Russell, R. S., J. C. Meunier, S. Takikawa, K. Faulk, R. E. Engle, J. Bukh, R. H. Purcell, and S. U. Emerson.** 2008. Advantages of a single-cycle production assay to study cell culture-adaptive mutations of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:4370-5.
48. **Sandrin, V., B. Boson, P. Salmon, W. Gay, D. Negre, R. Le Grand, D. Trono, and F. L. Cosset.** 2002. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* **100**:823-32.
49. **Silvie, O., S. Charrin, M. Billard, J. F. Franetich, K. L. Clark, G. J. van Gemert, R. W. Sauerwein, F. Dautry, C. Boucheix, D. Mazier, and E. Rubinstein.** 2006. Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *J Cell Sci* **119**:1992-2002.
50. **Silvie, O., C. Greco, J. F. Franetich, A. Dubart-Kupperschmitt, L. Hannoun, G. J. van Gemert, R. W. Sauerwein, S. Levy, C. Boucheix, E. Rubinstein, and D. Mazier.** 2006. Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the Plasmodium species. *Cell Microbiol* **8**:1134-46.
51. **Silvie, O., E. Rubinstein, J. F. Franetich, M. Prenant, E. Belnoue, L. Renia, L. Hannoun, W. Eling, S. Levy, C. Boucheix, and D. Mazier.** 2003. Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. *Nat Med* **9**:93-6.
52. **Sun, X., V. K. Yau, B. J. Briggs, and G. R. Whittaker.** 2005. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* **338**:53-60.
53. **Tscherne, D. M., C. T. Jones, M. J. Evans, B. D. Lindenbach, J. A. McKeating, and C. M. Rice.** 2006. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* **80**:1734-41.
54. **Voisset, C., M. Lavie, F. Helle, A. Op De Beeck, A. Bilheu, J. Bertrand-Michel, F. Terce, L. Cocquerel, C. Wychowski, N. Vu-Dac, and J. Dubuisson.** 2008. Ceramide enrichment of the plasma membrane induces CD81 internalization and inhibits hepatitis C virus entry. *Cell Microbiol* **10**:606-17.
55. **Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T. J. Liang.** 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**:791-6.
56. **Yalaoui, S., S. Zougbede, S. Charrin, O. Silvie, C. Arduise, K. Farhati, C. Boucheix, D. Mazier, E. Rubinstein, and P. Froissard.** 2008. Hepatocyte permissiveness to Plasmodium infection is conveyed by a short and structurally conserved region of the CD81 large extracellular domain. *PLoS Pathog* **4**:e1000010.
57. **Yancey, P. G., W. V. Rodriguez, E. P. Kilsdonk, G. W. Stoudt, W. J. Johnson, M. C. Phillips, and G. H. Rothblat.** 1996. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux. *J Biol Chem* **271**:16026-34.
58. **Yang, X., C. Claas, S. K. Kraeft, L. B. Chen, Z. Wang, J. A. Kreidberg, and M. E. Hemler.** 2002. Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell* **13**:767-81.
59. **Yang, X. H., O. V. Kovalenko, T. V. Kolesnikova, M. M. Andzelm, E. Rubinstein, J. L. Strominger, and M. E. Hemler.** 2006. Contrasting effects of EWI proteins, integrins, and protein palmitoylation on cell surface CD9 organization. *J Biol Chem* **281**:12976-85.
60. **Ye, J.** 2007. Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. *PLoS Pathog* **3**:e108.
61. **Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D. R. Burton, S. F. Wieland, S. L. Uprichard, T. Wakita, and F. V. Chisari.** 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9294-9.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Characterization of Huh-7 cells resistant to HCV infection. **A**, Huh-7 cells and R1 cell population were grown on coverslips and infected with JFH-1 HCVcc (m.o.i.=1). After 2 days, cells were fixed and processed for double-label immunofluorescence for capsid protein (green) and nuclei (blue, Hoechst). **B**, Huh-7 and Huh-7 R1 cells were infected with virus pseudotyped with HCV envelope proteins (HCVpp) or VSV G envelope protein (VSVpp). HCVpp were generated with envelope glycoproteins from 1a (HCVpp 1a) or 2a (HCVpp 2a) genotype. At 2 days post-infection, cells were lysed and processed to measure the Firefly luciferase activity. Luciferase activities were normalized for protein concentration in each cell lysate. Results are presented as relative percentages to HCVpp infectivity of Huh-7 cells and are reported as the mean \pm S.D. of three independent experiments. Pseudotyped particles produced in the absence of envelope proteins were used as controls. The mean fluorescence activity of such particles represented less than 2% of the activity measured for HCVpp. **C**, Huh-7 cells and R1 individual cellular clones were infected with HCVcc expressing *Renilla* luciferase. In parallel, Huh-7 cells and some of the clones were infected with HCVpp 1a, HCVpp 2a or VSVpp (**D**), as described above. At 2 days post-infection, cells were lysed and processed to measure the luciferase activities. Luciferase activities were normalized for protein concentration in each cell lysate. Results are presented as relative percentages to HCVcc (**C**) and HCVpp (**D**) infectivity on Huh-7 cells. HCVpp infections (**D**) were also normalized to VSVpp infections on Huh-7 cells. Results are reported as the mean \pm S.D. of three independent experiments. **E**, Surface biotinylated cell lysates were immunoprecipitated with anti-CD81, anti-SR-BI or anti-CLDN-1 mAbs. Proteins were revealed by Western blotting with HRP-conjugated NeutrAvidin.

Figure 2: Ectopic expression of CD81 in Huh-7w7 cells restores HCV permissivity. **A**, Flow cytometry analysis of CD81 cell surface expression on different cell lines. Cells were stained using an anti-hCD81 (5A6, left panel) or an anti-mCD81 (MT81, right panel), and secondary antibodies conjugated with PE. Ctrl corresponds to Huh-7 cells stained only with secondary antibody. **B**, Cell lines were infected with HCVcc expressing *Renilla* luciferase and in parallel with HCVpp generated with envelope proteins from different genotypes or virus pseudotyped with feline endogenous virus RD114 glycoprotein (Rd114pp) (**C**). At 2 days post-infection, cells were lysed and processed to measure the luciferase activities. The luciferase activities were normalized for protein concentration in each cell lysate. Results are presented as relative percentages to HCVcc (**B**) and HCVpp (**C**) infectivity on Huh-7 cells and reported as the mean \pm S.D. of three independent experiments.

Figure 3: Anti-hCD81 mAb inhibits HCV infection of hCD81 expressing cells but not of Huh-7w7/mCD81 cells. HCVcc (upper panel) and HCVpp 2a (lower panel) infections of cell lines were performed in presence (black histograms) or absence (white histograms) of 1.3.3.22 anti-hCD81 mAb (3mg/ml). At 2 days post-infection, cells were lysed and processed to measure their luciferase activities. Luciferase activities were normalized for protein concentration in each cell lysate. Results are reported as the mean \pm S.D. of three independent experiments.

Figure 4: Neutralization assay of HCV infection with MT81 and MT81w antibodies. A, Flow cytometry analysis of Huh-7w7/mCD81 cells stained with the mAbs MT81 and MT81w. Cells stained only with PE-conjugated secondary antibody were used as control (dotted line). HCVcc (**B**) and HCVpp (**C**) infections of Huh-7w7/mCD81 cells were performed in presence of indicated concentrations of MT81 (left panels) or MT81w (right panels) mAbs. At 2 days post-infection, cells were lysed and processed to measure the luciferase activities. The luciferase activities were normalized for protein concentration in each cell lysate. Results are reported as the mean \pm S.D. of three independent experiments.

Figure 5: Depletion of cellular cholesterol decreases HCV infection of Huh-7w7/mCD81 cells. Huh-7w7/mCD81 cells were pretreated with increasing concentrations of MbCD prior to infection with HCVcc (**A**) or HCVpp 2a (**B**). Huh-7w7/mCD81 cells were untreated (NT) or pretreated with 7.5 mM of MbCD (MbCD) and then treated or not with 2.5 mM of preformed MbCD-Cholesterol complexes (Chol) (C and D). After treatment, cells were infected with HCVcc (C) or HCVpp-2a or VSVpp (D). At 2 days post-infection, cells were lysed and processed to measure the luciferase activities. Luciferase activities were normalized for protein concentration in each cell lysate. Results are reported as the mean \pm S.D. of three independent experiments.

Figure 6: Depletion of cellular cholesterol decreases HCV infection of Huh-7 cells. A, Huh-7 cells were pretreated with increasing concentrations of MbCD prior to HCVpp 2a infection (left panel). Cells were untreated (NT) or pretreated with 7.5 mM of MbCD (MbCD) and then treated or not with 2.5 mM of preformed MbCD-Cholesterol complexes (Chol) (right panel). At 2 days post-infection with HCVpp 2a, cells were lysed and processed to measure their luciferase activities. Luciferase activities were normalized for protein concentration in each cell lysate. Results are reported as the mean \pm S.D. of three independent experiments. **B,** Flow cytometry analysis of CD81 and CD151 expression on the cell surface of Huh-7 cells. Upper panels: cells were treated with 7.5mM of MbCD (MbCD) or left untreated (NT). Middle panels: cells were treated with 7.5mM of MbCD (MbCD) followed by 2.5mM of MbCD-

Cholesterol (MbCD + Chol). Lower panels: cells were treated with 2.5mM of MbCD-Cholesterol (Chol) or left untreated (NT).

Figure 7: Cholesterol depletion affects total CD81 cell surface expression. **A**, Flow cytometry analysis of CD81 and CD151 expression on the cell surface of Huh-7w7/mCD81 cells. Upper panels: cells were treated with 7.5mM of MbCD (MbCD) or left untreated (NT). Middle panels: cells were treated with 7.5mM of MbCD (MbCD) followed by 2.5mM of MbCD-Cholesterol (MbCD + Chol). Lower panels: cells were treated with 2.5mM of MbCD-Cholesterol (Chol) or left untreated (NT). **B**, Cells were treated with 7.5mM of MbCD (MbCD) followed by increasing concentrations (in mM) of MbCD-Cholesterol (MbCD + Chol) and total cell surface CD81 expression compared to untreated cells (NT) was measured using MT81 mAb.

Figure 8: Ceramide enrichment of the plasma membrane of Huh-7 cells inhibits HCV entry. **A**, Huh-7 cells were pretreated (+Smase) or not (-Smase) with Smase prior to infection with HCVcc, HCVpp 2a or VSVpp. At 2 days post-infection, cells were lysed and processed to measure their luciferase activities. Luciferase activities were normalized for protein concentration in each cell lysate. Results are reported as the mean \pm S.D. of three independent experiments. **B**, Huh-7 cells pretreated (+Smase) or not (-Smase) with Smase were stained with 5A6 (left panel) or TS151 (right panel) mAbs. Cells stained only with PE-conjugated secondary antibody were used as control (dotted line).

Figure 9: Ceramide enrichment of the plasma membrane of Huh-7w7/mCD81 cells inhibits HCV entry and increases association of CD81 with TEMs. **A**, Huh-7w7/mCD81 cells were pretreated (+Smase) or not (-Smase) with Smase prior to infection with HCVcc or HCVpp 2a. At 2 days post-infection, cells were lysed and processed to measure the luciferase activities. The luciferase activities were normalized for protein concentration in each cell lysate. Results are reported as the mean \pm S.D. of three independent experiments. **B**, Huh-7w7/mCD81 cells pretreated (+Smase) or not (-Smase) with Smase were stained with MT81 (left panel), MT81 \underline{w} (middle panel) or TS151 (right panel) mAbs. Cells stained only with PE-conjugated secondary antibody were used as control (dotted line).

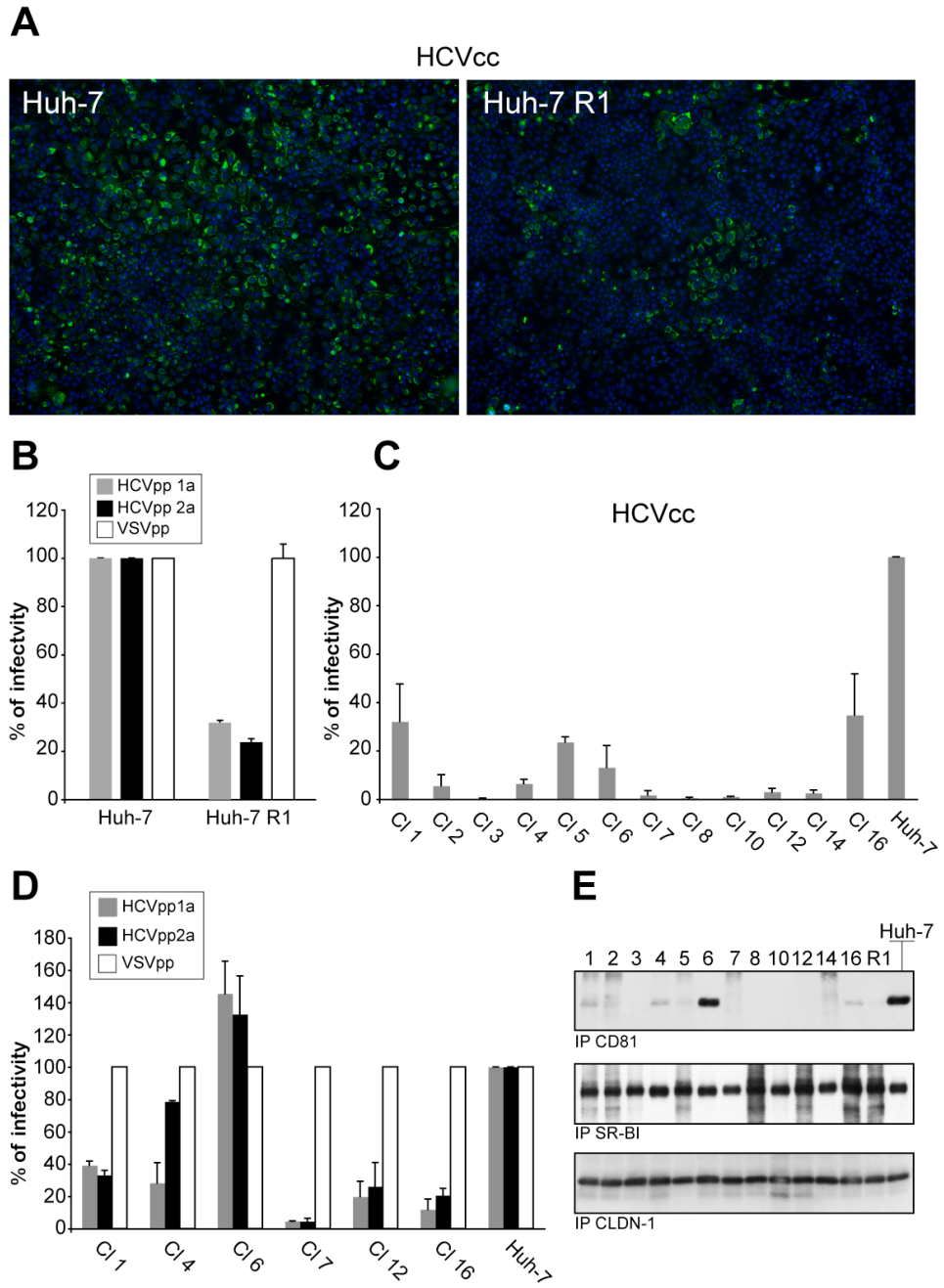


Fig 1

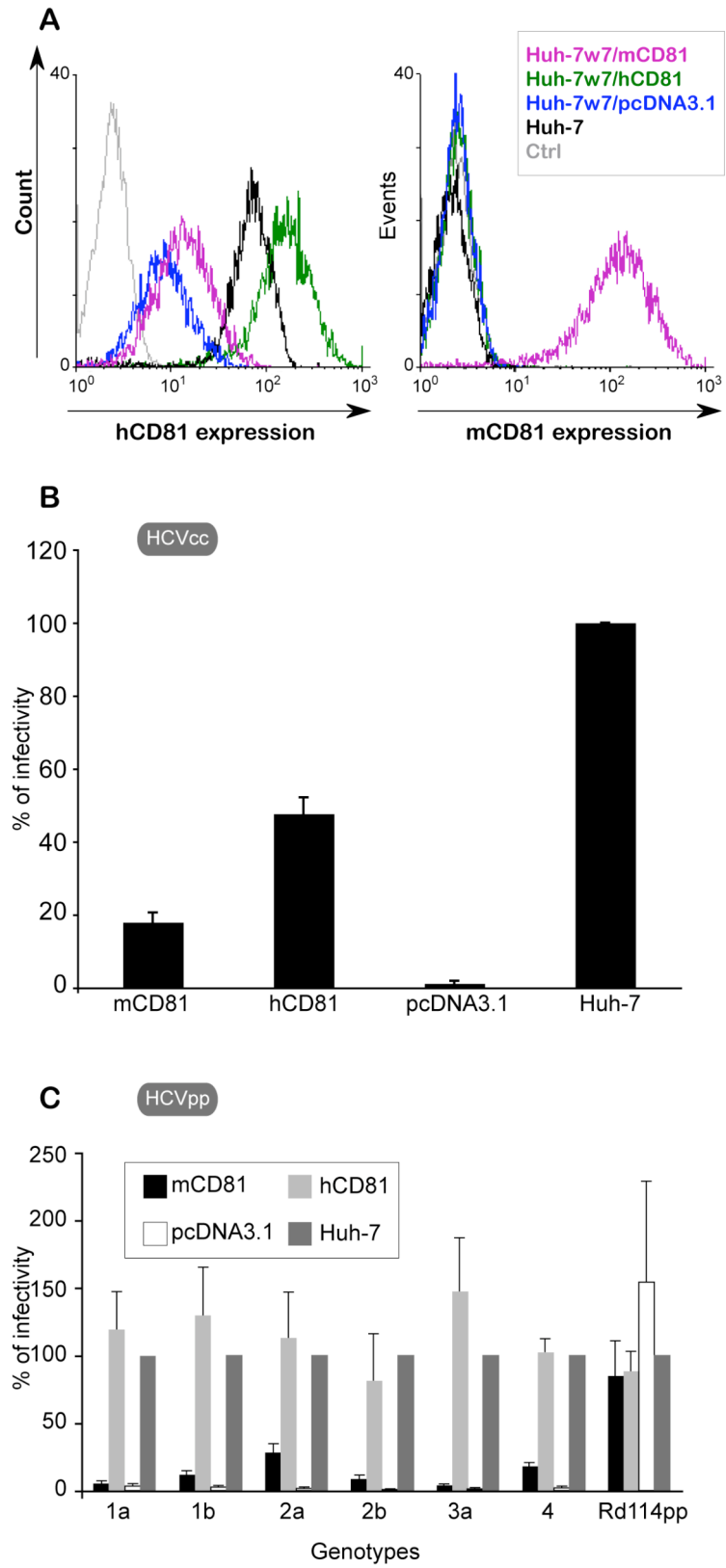


Fig 2

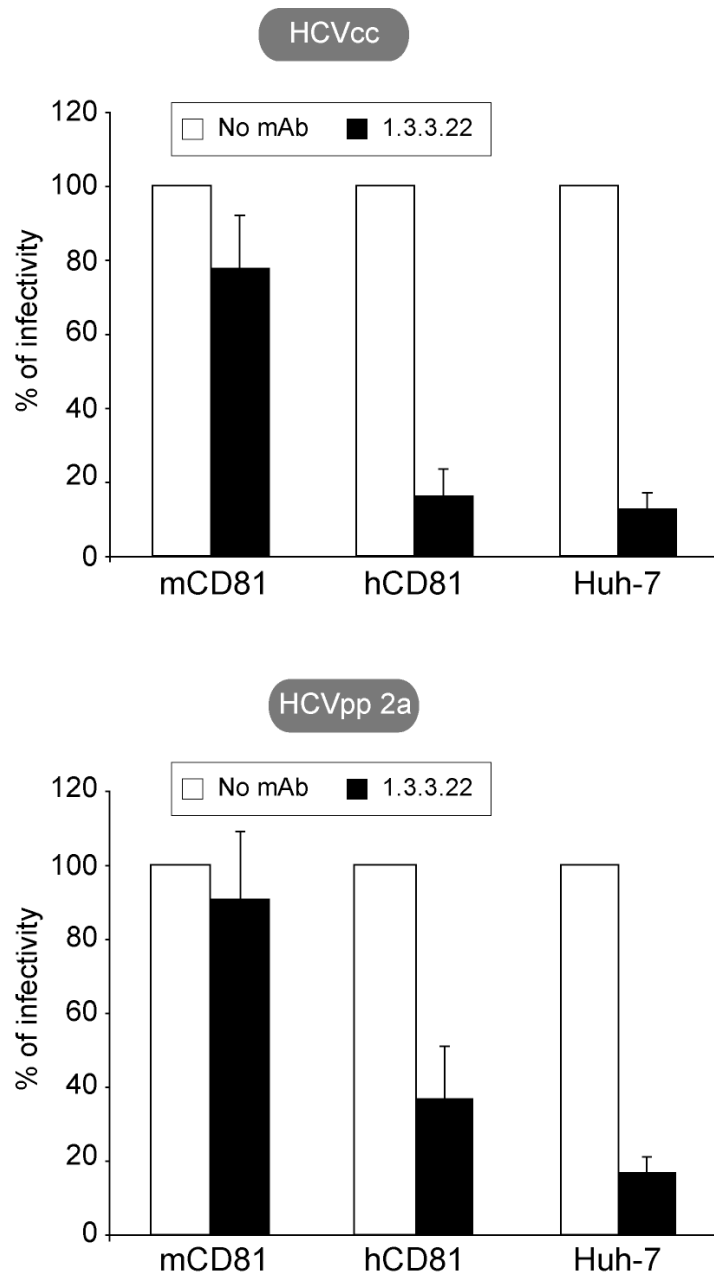


Fig 3

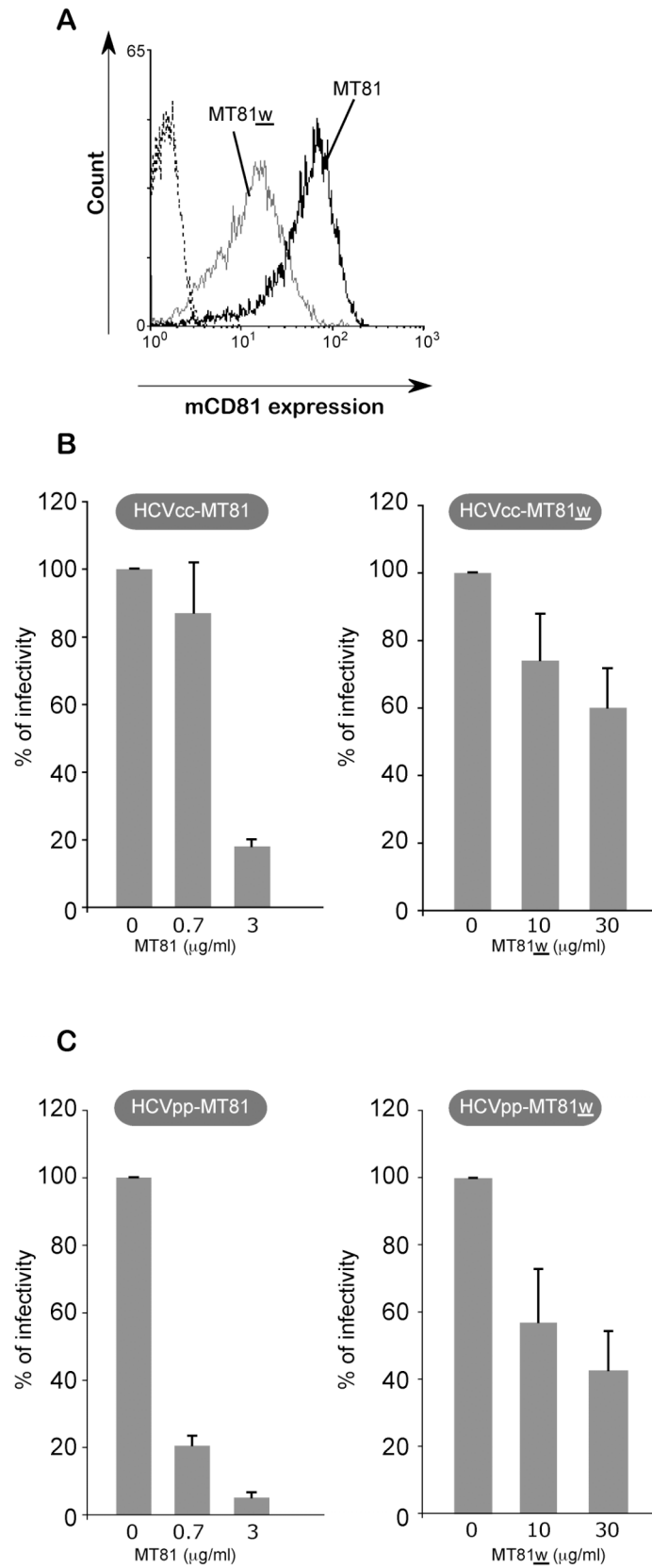


Fig 4

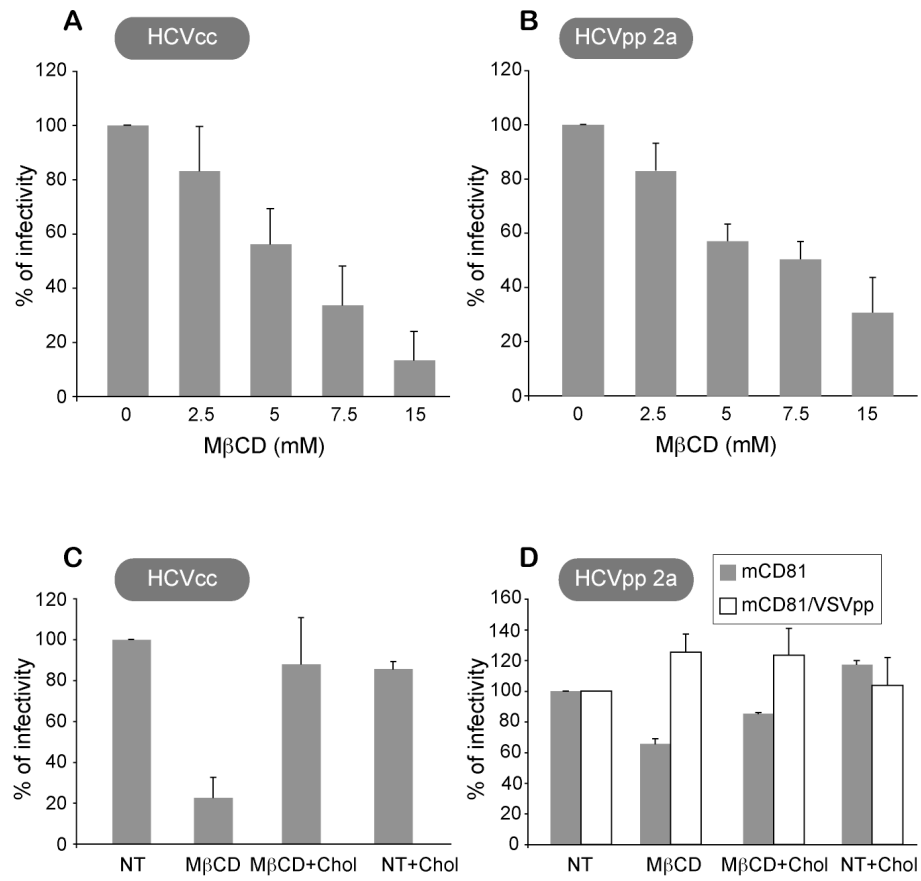


Fig 5

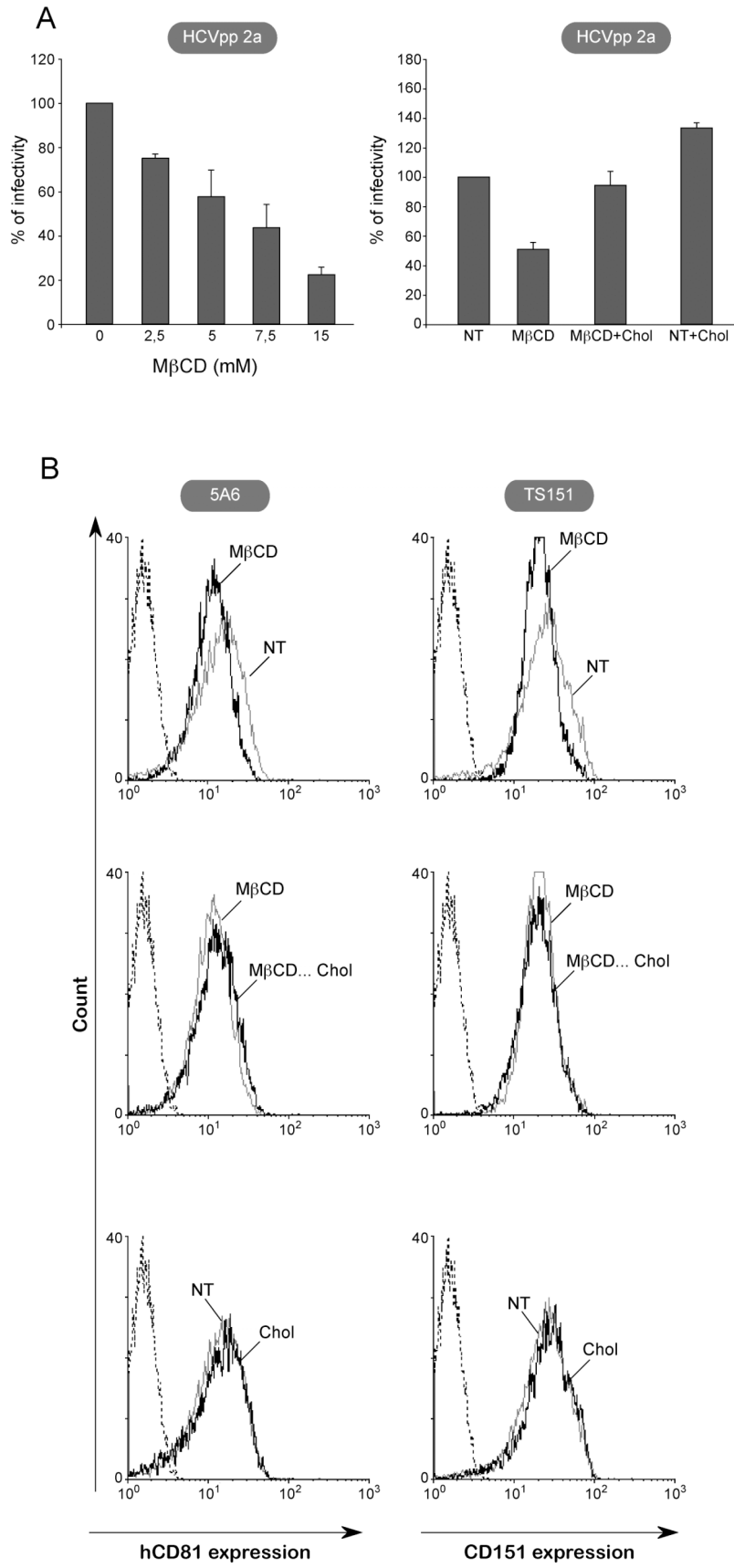


Fig 6

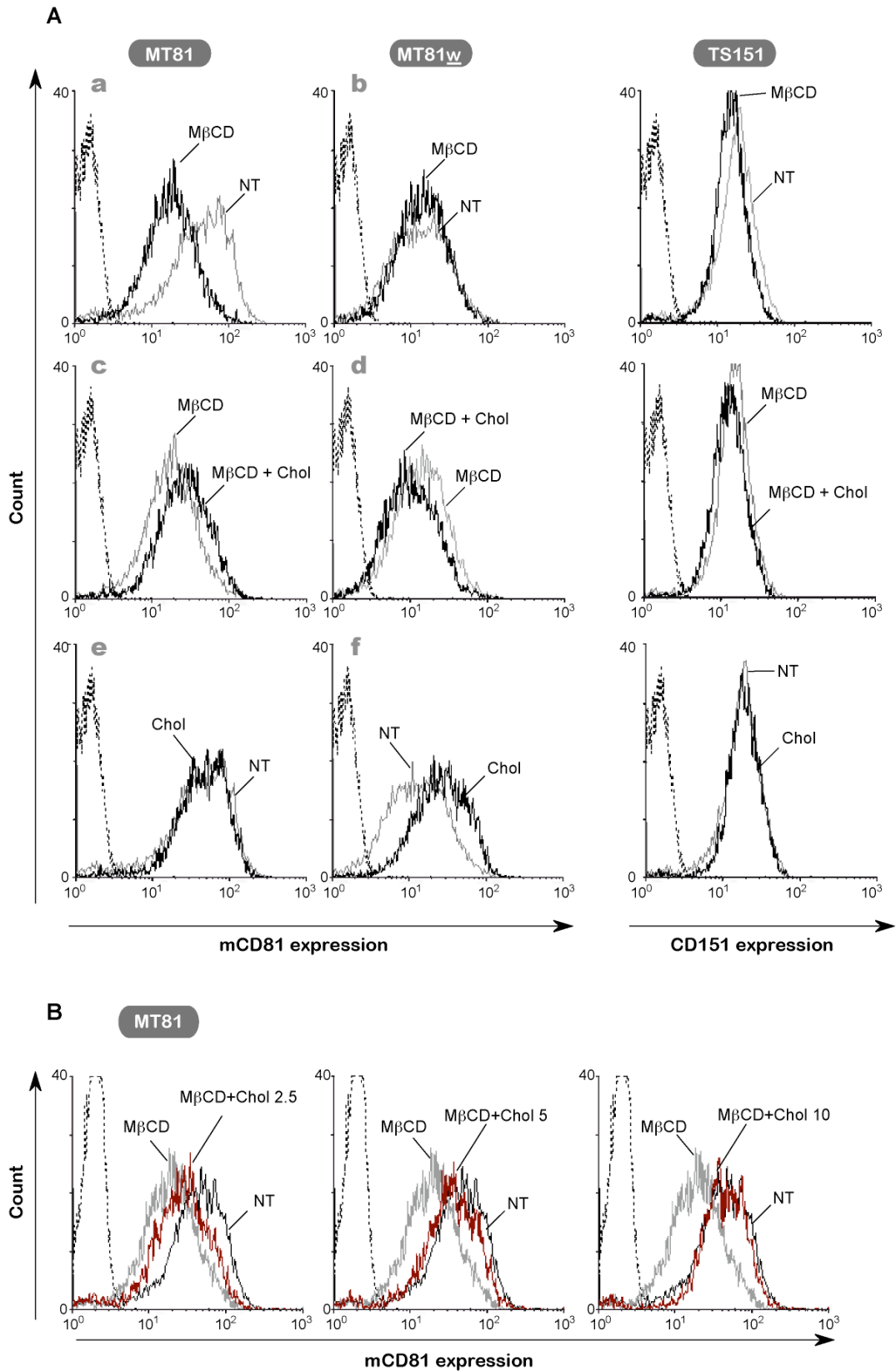


Fig 7

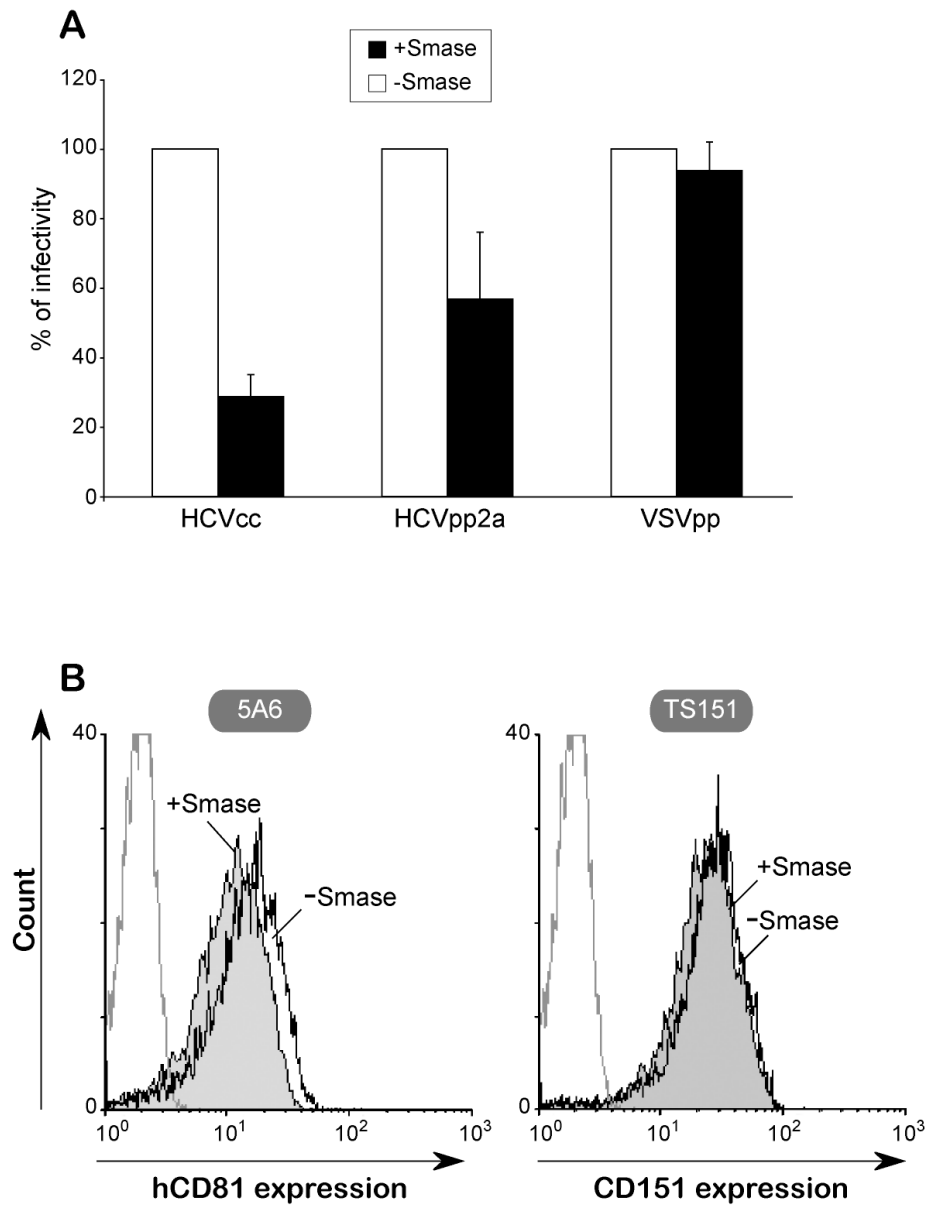


Fig 8

Résultats

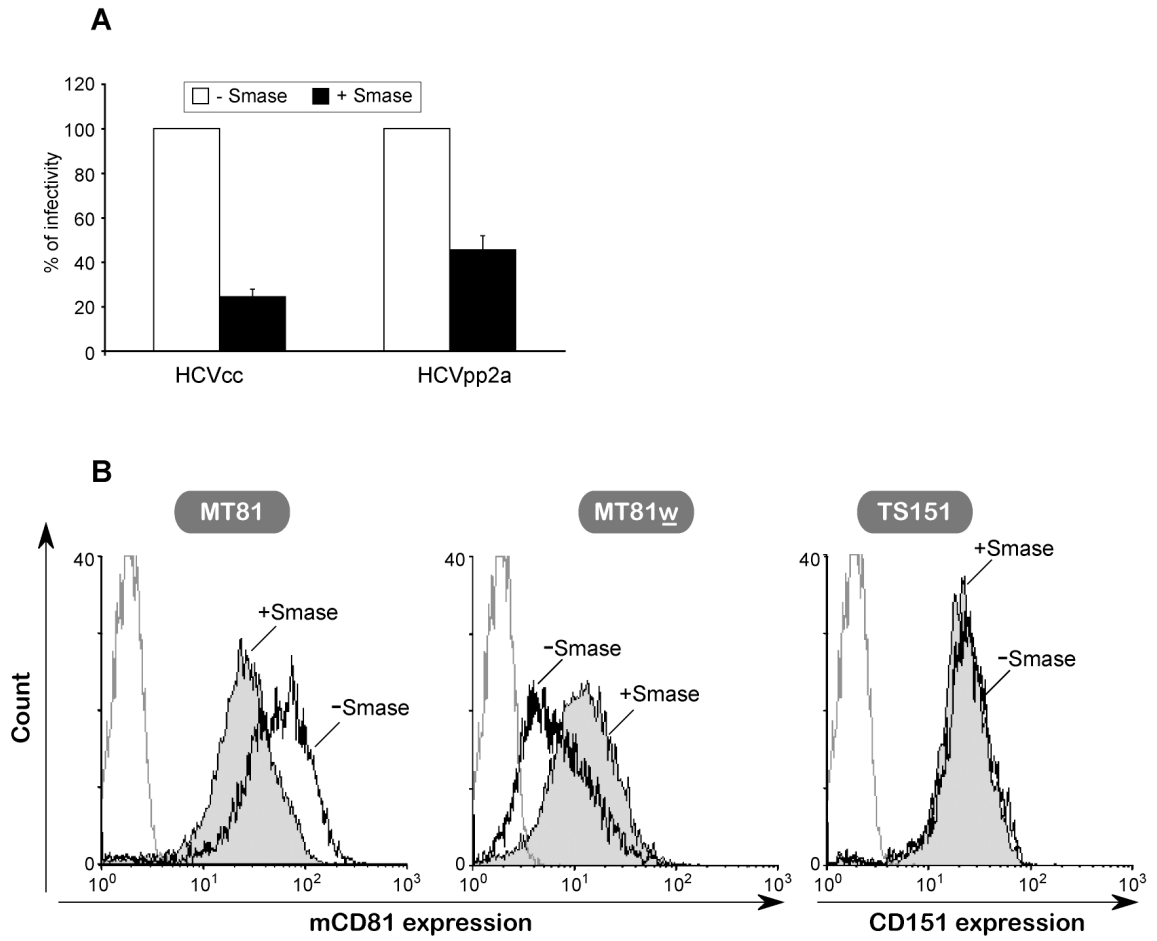


Fig 9

Discussion et Perspectives

Le VHC utilise plusieurs récepteurs pour entrer dans les cellules, tels que les GAG, le LDL-R, le SR-BI et la CD81. Cependant, l'expression de ces molécules n'étant pas limitée aux hépatocytes, cela n'explique pas le tropisme viral pour le foie. Récemment, il a été montré que la Claudine-1 participe également à l'entrée virale, mais son expression n'est pas non plus limitée aux hépatocytes. De plus, il a été montré que les Claudines -6 et -9 sont également capables de rendre certaines lignées non hépatocytaires permissives à l'infection. En effet, l'expression ectopique de ces trois Claudines dans des lignées telles que les HEK-293T permet l'infection par le VHC. Toutefois, d'autres lignées cellulaires demeurent résistantes, telle que les HeLa. Ceci suggère qu'un ou plusieurs facteur (s) additionnel (s) de l'hôte joue (ent) un rôle dans le mécanisme d'entrée du VHC. Durant ma thèse, nous nous sommes intéressés à la tétraspanine CD81 et tout particulièrement à sa capacité à interagir avec d'autres tétraspanines et avec des protéines partenaires.

1. Le partenaire de CD81, EWI-2wint, inhibe l'entrée du VHC

Dans ce travail, nous avons identifié un partenaire de CD81 capable d'inhiber l'interaction *in vitro* entre le récepteur CD81 et les glycoprotéines virales E1 et E2. Nous avons en effet observé l'absence d'interaction entre des hétérodimères E1E2 immobilisés sur des billes et CD81 issue de certaines lignées cellulaires, lysées dans des conditions de détergents qui gardent les complexes primaires ou les *tetraspanin webs* intacts. Nous avons montré qu'il y avait une corrélation directe entre l'expression cellulaire de ce partenaire, normalement absent des hépatocytes, et l'inhibition de l'interaction CD81/E1E2. Des analyses de spectrométrie de masse ont montré que ce nouveau partenaire, appelé EWI-2wint, est issu du clivage de la protéine EWI-2, un des partenaires majeurs de CD81. EWI-2 appartient à une sous-famille de protéines à domaines Ig, appelées protéines EWI, récemment décrite. Nous avons montré que le clivage d'EWI-2 pour former EWI-2wint a lieu entre les deux premiers domaines Ig N-terminaux d'EWI-2. C'est pourquoi, nous avons appelé cette protéine EWI-2wint, pour *EWI-2 without its N-terminus*.

Nos tentatives pour exprimer EWI-2wint directement dans les lignées hépatocytaires ont été infructueuses, suggérant que la protéine EWI-2wint (EWI-2 sans son domaine N-terminal) est probablement instable dans la voie de sécrétion. L'expression d'EWI-2wint dans ces cellules a été obtenue par l'ajout d'une arginine en amont de la séquence d'EWI-2wint, formant une protéine EWI-2 avec un site de clivage de l'endopeptidase furine (RGRR). Ce site de clivage naturel est formé par le motif RGR présent dans la séquence d'EWI-2, juste en amont de la séquence d'EWI-2wint et l'arginine qui a été ajoutée. Des cellules

hépatocytaires Huh-7 exprimant de manière stable EWI-2 avec ce site de clivage modifié permettent une forte production d'EWI-2wint. De manière intéressante, l'infection par les VHCcc est réduite dans les cellules produisant EWI-2wint, par rapport aux cellules contrôles qui ne l'expriment pas. De plus, EWI-2wint n'affecte ni les étapes de synthèse des protéines virales et de réplication du génome, ni celles d'assemblage et de sécrétion de nouvelles particules virales. En effet, ceci a été démontré par la transfection de l'ARN viral dans les cellules exprimant ou non EWI-2wint et par l'utilisation du surnageant de ces cellules transfectées pour infecter des cellules naïves. Les cellules transfectées exprimaient des niveaux de la protéine de capsid virale similaires aux cellules contrôles. L'infectiosité des surnageants de culture des cellules produisant EWI-2wint indiquait que la transfection de l'ARN viral dans ces cellules permettait l'assemblage et la sécrétion de particules néosynthétisées de manière comparable aux cellules contrôles.

De manière originale, nous avons montré que l'expression d'EWI-2wint est capable d'inhiber l'entrée du VHC dans ses cellules cibles, en altérant l'interaction récepteur-glycoprotéines virales. Ce type de mécanisme d'inhibition n'avait jamais été montré auparavant et il nous permet de jeter un regard nouveau non seulement sur les mécanismes précoces d'entrée du VHC, mais également sur les premières étapes du cycle infectieux d'autres agents pathogènes. Une connaissance détaillée du processus par lequel EWI-2wint est produite, de son mode d'interaction avec CD81, de sa localisation subcellulaire et de son interaction avec d'autres molécules du *tetraspanin web* ou des molécules impliquées dans des voies de signalisation est essentielle pour la compréhension de sa fonction inhibitrice sur l'infection du VHC.

La résistance au VHC pourrait donc être non seulement liée à l'absence d'expression de facteurs spécifiques permettant l'entrée virale, mais également à l'expression d'EWI-2wint dans ces cellules. L'absence de permissivité des cellules HEK-293T a été associée à une absence d'expression des CLDN, puisque leur expression ectopique permet de conférer une sensibilité à l'infection (Evans et al., 2007; Meertens et al., 2008; Zheng et al., 2007). De manière intéressante, nous avons observé que ces cellules n'expriment pas EWI-2wint. Pour les cellules non permissives exprimant EWI-2wint, son influence dans l'hépatotropisme viral pourrait être analysée à travers l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre EWI-2. Le traitement de cellules non permissives qui expriment tous les facteurs d'entrée positifs et le facteur négatif EWI-2wint devrait les rendre permissives à l'infection. Nous avons identifié deux lignées cellulaires non permissives exprimant les différents facteurs d'entrée ainsi qu'EWI-2wint, les cellules HeLa exprimant de manière ectopique les CLDN et les cellules de carcinome épidermique A431. Cependant, ces deux lignées ne sont pas permissives à la réplication du génome du VHC. Des expériences supplémentaires avec des lignées

cellulaires non permissives exprimant tous les facteurs d'entrée positifs connus et supportant la réplication du génome viral sont nécessaires pour déterminer si l'inhibition de EWI-2wint endogène est suffisante pour induire une permissivité au VHC. Dans nos expériences, nous pourrions utiliser des VHCcc-luciférase, qui permettent une quantification très sensible des niveaux d'infection par la mesure de l'activité de la luciférase. D'autre part, l'étape d'entrée virale pourrait être étudiée en utilisant les VHCpp. Des expériences d'interaction *in vitro* entre CD81 issu de cellules traitées et des hétérodimères E1E2 du VHC pourraient confirmer nos résultats.

Nous avons également utilisé des ARN interférents dirigés contre EWI-2 pour restaurer l'infection des Huh-7 produisant EWI-2wint par le clivage par la furine. Néanmoins, nos résultats n'ont pas été concluants. Il nous a été très difficile d'inhiber complètement EWI-2. Dans ce sens, il semblerait qu'EWI-2wint soit capable d'inhiber l'infection du VHC même lorsqu'elle est exprimée faiblement. Toutefois, il est important de noter que le traitement des cellules Huh-7 naïves avec des ARN interférents dirigés contre EWI-2 n'affecte pas l'infection des VHCcc. Ceci indique que, bien qu'EWI-2 soit un partenaire majeur de CD81, elle ne participe pas au processus d'entrée du VHC.

2. Caractérisation du mécanisme inhibiteur d'EWI-2wint

Bien qu'EWI-2wint soit capable d'inhiber l'entrée du VHC, le mécanisme exact d'inhibition reste à déterminer. En effet, il serait intéressant de savoir si EWI-2wint masque l'accessibilité des glycoprotéines virales à CD81 par encombrement stérique ; si EWI-2wint induit un changement conformationnel dans la structure de CD81 empêchant son interaction avec le virus ; si EWI-2wint bloque l'association et/ou la dissociation de CD81 avec d'autres molécules jouant un rôle dans l'entrée virale ; si EWI-2wint bloque la (les) voie (s) de signalisation induite (s) par CD81 suite à l'interaction avec le virus; ou alors si EWI-2wint modifie l'association de CD81 avec les microdomaines enrichis en tétraspanines.

Par ailleurs, nous sommes en train de produire des formes solubles d'EWI-2wint afin d'identifier celle ayant le même pouvoir inhibiteur que la protéine entière. Ces formes devraient permettre d'identifier le (s) domaine (s) impliqué (s) dans l'inhibition de l'interaction entre E1E2 et CD81 afin de développer des peptides ou mini-protéines qui pourront constituer de nouveaux outils potentiels dans le cadre du développement de nouveaux agents thérapeutiques. Une autre stratégie thérapeutique serait d'induire, dans les hépatocytes, le clivage d'EWI-2 conduisant à la production d'EWI-2wint. Néanmoins, le rôle physiologique d'EWI-2 n'est pas encore bien établi.

2.1. Les domaines d'interaction entre CD81 et EWI-2wint

Dans la continuité de mon travail, il serait intéressant d'identifier les domaines d'interaction entre EWI-2wint et CD81 à l'aide de protéines chimériques entre les protéines de la famille EWI (EWI-2/EWI-101 et EWI-2wint/EWI-101), ainsi qu'entre les tétraspanines CD81 et CD82, qui ne s'associe pas à EWI-2. Une analyse plus fine des résidus impliqués dans cette interaction pourra alors être envisagée par mutagenèse dirigée.

Des régions d'interaction entre les tétraspanines et leurs partenaires ont été identifiées à l'aide de protéines chimériques. Il apparaît que ces régions diffèrent d'une tétraspanine à l'autre et d'un partenaire à l'autre. En effet, l'interaction CD81/CD19 fait intervenir la LEL de CD81 et le domaine extracellulaire de CD19, bien que le premier TMD de CD81 puisse également être impliqué (Shoham et al., 2006). L'interaction entre la tétraspanine CD151 et l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ semble se faire également entre la LEL de CD151 et le domaine extracellulaire de l'intégrine (Berditchevski et al., 2001). Par contre, deux régions de la tétraspanine CD9 semblent jouer un rôle dans son association avec EWI-2 : une région comprise entre la moitié du deuxième TMD et le début de la LEL, et une région comprise entre le motif CCG de la LEL et le quatrième TMD (Charrin et al., 2003a). Ces deux régions contribuent de manière indépendante à l'interaction avec EWI-2, néanmoins les deux sont nécessaires pour observer un niveau d'interaction maximal. Ces régions de CD9 ont peu de similarité de séquence avec CD81, suggérant que celle-ci s'associe avec EWI-2 d'une manière différente (Charrin et al., 2003a). De son côté, la région d'EWI-2 responsable de son interaction avec les tétraspanines CD81 et CD9 est probablement présente dans l'extrémité C-terminale de la protéine (Charrin et al., 2003a; Kolesnikova et al., 2004; Stipp et al., 2001a ; Stipp et al., 2003a). En effet, une protéine chimérique où la queue cytoplasmique d'EWI-2 a été remplacée par celle de la protéine CD2 ne s'associe plus à CD81, alors que l'interaction avec CD9 est conservée (Stipp et al., 2003a).

Des résultats préliminaires avec les chimères CD81/CD82 indiquent qu'un ou plusieurs TMD de CD81 pourraient être impliqués dans l'interaction avec EWI-2 et EWI-2wint. En effet, les chimères CD81/CD82 possédant les deuxième et troisième TMD de CD82 présentent une interaction très réduite avec EWI-2 et EWI-2wint. Le quatrième TMD et la SEL de CD81 ne semblent pas être impliqués. De manière intéressante le premier, le deuxième et le troisième TMD de CD81 possèdent un motif à glycine G/A/SXXXG/A/S qui pourrait interagir avec les TMD d'EWI-2 et EWI-2wint qui présentent un double domaine à glycine GXXXAXXXG suivi d'un simple motif AXXXG. Ce type de domaine à glycine, appelé glycine zipper (G/A/SXXXG/A/SXXXG/A/S) est décrit comme un domaine d'interaction et d'hétérodimérisation (Kim et al., 2005). EWI-F, un autre membre de la famille des EWI capable d'interagir avec CD81, contient aussi un glycine zipper dans son TMD (GXXXSXXXG).

Nos analyses indiquent qu'EWI-2 et EWI-2wint hétérodimèrisent et que cette interaction est stable même dans des conditions de détergents qui normalement dissocient le *tetraspanin web*, comme le Triton X-100. Il serait donc possible que, dans le contexte cellulaire naturel, EWI-2wint interagisse avec CD81 via EWI-2. Dans le but d'analyser l'hétérodimérisation entre EWI-2 et EWI-2wint, ainsi que leur interaction avec CD81 via le domaine glycine zipper présent dans leur TMD, nous avons substitué les glycines par des leucines. De manière intéressante, ces mutations n'ont pas altéré l'interaction entre EWI-2 et EWI-2wint, mais tous les mutants présentaient des interactions réduites avec CD81. Des insertions d'alanines dans les domaines à glycines présents dans les TMD de CD81 et dans le TMD d'EWI-2/EWI-2wint devraient permettre de déterminer quels résidus sont importants pour l'interaction entre CD81 et EWI-2/EWI-2wint.

D'autre part, il a été montré qu'EWI-F est capable d'inhiber l'association de la prostaglandine $F_{2\alpha}$ à son récepteur, en s'associant avec lui et en diminuant son expression (Orlicky, 1996). Cependant, EWI-2wint n'induit pas une diminution du nombre de récepteurs CD81 capables de se lier aux glycoprotéines virales. Une autre hypothèse serait qu'EWI-2wint pourrait interagir directement avec le virus. Cette possibilité pourrait être investiguée par pontage covalent des particules virales avec des cellules exprimant EWI-2wint. Cependant, des grandes quantités de virus purifiés sont nécessaires pour de telles expériences. D'autres possibilités seraient de réaliser des interactions *in vitro* entre les hétérodimères E1E2 du VHC et la protéine EWI-2wint immobilisée sur des billes, ou alors des infections avec des particules virales pré-incubées avec une forme soluble d'EWI-2wint.

L'utilisation d'un panel d'anticorps monoclonaux, conformationnels ou non, dirigés contre CD81 devrait permettre de déterminer si EWI-2wint bloque le site de CD81 responsable de l'interaction avec E1E2 du VHC. Des changements conformationnels ont par exemple lieu dans la tétraspanine CD9 lorsque celle-ci est associée aux intégrines β_1 (Gutierrez-Lopez et al., 2003).

2.2. EWI-2wint et l'association/dissociation de CD81 avec d'autres molécules

Les données obtenues jusqu'à présent sur l'étape d'entrée du VHC indiquent que la tétraspanine CD81 joue un rôle après l'attachement des particules virales (Cormier et al., 2004b; Koutsoudakis et al., 2006; Morikawa et al., 2007; Zeisel et al., 2007). Il semblerait que CD81 et SR-BI coopèrent pendant une étape post-attachement du virus, avec des participations intimement liées (Kapadia et al., 2007; Zeisel et al., 2007). De plus, la CLDN-1 est capable d'interagir avec CD81 et LDL-R lorsqu'elle est sur-exprimée dans les cellules (Yang et al., 2008) et il semblerait qu'elle participe à l'entrée virale après l'action de CD81 et de SR-BI (Evans et al., 2007). L'ensemble de ces résultats indique que l'entrée du VHC dans les hépatocytes a lieu après des interactions successives du virus avec ces différentes

molécules, suggérant que leur association et/ou dissociation sont probablement des processus importants pour le mécanisme d'entrée.

Comme expliqué dans l'introduction, la composition du *tetraspanin web* varie selon la lignée cellulaire et les tétraspanines ont une influence sur les fonctions de leurs partenaires. Les partenaires pourraient également influencer les interactions entre les membres du *tetraspanin web* et EWI-2wint pourrait bloquer l'association et/ou la dissociation de CD81 avec d'autres molécules jouant un rôle dans l'entrée virale. Afin d'investiguer cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier les régions d'association, dans la membrane plasmique, à la fois entre CD81 et EWI-2wint et entre CD81 et les autres molécules de l'entrée virale. Des analyses de localisation subcellulaire de CD81 et d'EWI-2wint sont en cours afin de savoir si EWI-2wint modifie la localisation subcellulaire de CD81. Dans ce sens, il a été montré que la surexpression d'EWI-2 est capable d'induire une re-localisation de CD81 vers la périphérie cellulaire, surtout au niveau des filopodes, zones riches en intégrine $\alpha 3\beta 1$ (Stipp et al., 2003a). En outre, des expériences de microscopie confocale devraient permettre de déterminer si CD81, SR-BI, CLDN et EWI-2wint colocalisent ou non. De manière plus détaillée, les dynamiques de distribution de ces molécules dans la membrane plasmique pourraient être analysées par microscopie TIRF (*total internal reflection fluorescence*), où chaque molécule est marquée par un anticorps de couleur différente et leurs mouvements à la membrane sont observés par microscopie en temps réel (*live imaging*). De plus, des analyses de l'interaction de ces protéines par FRET (*fluorescence resonance energy transfert*) pourraient indiquer s'il existe une interaction physique entre les protéines à la membrane cellulaire. Récemment, Harris et collaborateurs ont réalisé ce type d'analyse et ont montré que CD81 et CLDN-1 s'associent à la membrane des hépatocytes (Harris et al., 2008).

2.3. EWI-2wint et CD81, les voies de signalisation et l'interaction avec le cytosquelette

Les tétraspanines sont capables d'induire des voies de signalisation intracellulaires, par exemple via leur interaction avec les intégrines, en agissant comme des « adaptateurs » entre les intégrines et des molécules de signalisation (Berditchevski and Odintsova, 1999; Berditchevski et al., 1997; Zhang et al., 2001). Les tétraspanines peuvent également interagir directement avec des molécules de signalisation, comme la PKC (Zhang et al., 2001) et les récepteurs couplés aux protéines G (Little et al., 2004), ou encore activer des voies de signalisation, telles que la voie ERK/MAPK (Cai et al., 1997; Carloni et al., 2004; Kolch et al., 1993; Murayama et al., 2004). CD81 est une protéine adaptatrice avec ses domaines extra-cellulaires qui interagissent avec les protéines de surface et ses queues cytoplasmiques qui interagissent avec les molécules de signalisation, comme la PKC (Zhang

et al., 2001). Toutefois, les voies de signalisation activées par le VHC via les récepteurs cellulaires ont été jusqu'à présent peu exploitées. Récemment, il a été montré que, dans les cellules Huh-7, l'activation de la voie des Rho GTPases par l'engagement de CD81 induit une relocalisation des complexes E2/CD81 vers les régions riches en CLDN-1, de manière dépendante de l'actine (Brazzoli et al., 2008). Une autre étude récente montre que l'interaction entre CD81 et CLDN-1 à la surface des cellules hépatocytaires Huh-7.5 est dépendante de la protéine kinase A (PKA) et que les cellules infectées présentent des niveaux augmentés d'AMP cyclique et de substrats phosphorylés de la PKA (Farquhar et al., 2008). De plus, il a été montré que dans les cellules hépatocytaires Huh-7, les hépatocytes primaires L02, les cellules lymphoïdes Molt-4 et des lymphocytes T, la voie de signalisation des kinases ERK/MAPK est stimulée par la glycoprotéine E2 via CD81 et LDL-R (Crotta et al., 2006; Zhao et al., 2005; Zhao et al., 2006; Zhao et al., 2007). L'activation de cette voie par l'engagement de CD81 semble faire partie des événements post-entrée virale (Brazzoli et al., 2008). Par contre, dans les cellules NK cette voie de signalisation est inhibée par l'engagement de CD81 par E2 (Crotta et al., 2006). Les hépatocytes et les cellules lymphoïdes Molt-4 n'expriment pas EWI-2wint, alors que son expression dans les cellules NK n'est pas connue. Dans l'hypothèse que l'interaction entre CD81 et E2 induit des voies de signalisation intracellulaire, l'effet inhibiteur d'EWI-2wint pourrait se faire par un blocage de l'induction de cette (ces) voie (s).

L'interaction des tétraspanines avec les partenaires, notamment les intégrines, permet une association avec le cytosquelette des cellules. Par ailleurs, EWI-2, EWI-F et CD81 colocalisent et interagissent avec les protéines ERM, concentrées dans les structures riches en actine et impliquées dans les interactions entre la membrane plasmique et le cytosquelette (Sala-Valdes et al., 2006). Ces protéines existent sous deux états conformationnels : une forme repliée inactive et soluble dans le cytoplasme, et une forme active dépliée (Louvet-Vallee, 2000). Cet état conformationnel dépend de la phosphorylation de résidus tyrosine conservés présents dans leur domaine C-terminal. Cette phosphorylation dissocie l'association intramoléculaire entre les domaines N- et C-terminaux de la forme inactive, permettant ainsi à la protéine de se déplier et d'acquérir une forme active. Il a été montré que la réplication du VHC semble requérir la polymérisation d'actine et des microtubules (Bost et al., 2003), qui pourrait être induite par l'engagement de CD81. En effet, l'engagement de CD81 par des anticorps monoclonaux dirigés contre celle-ci ou par la glycoprotéine E2 induit une phosphorylation de l'eitrine (Coffey, 2006) et un réarrangement des filaments d'actine (Coffey, 2006; Crotta et al., 2006). Ce réarrangement relocalise les complexes E2/CD81 vers les régions riches en CLDN-1 (Brazzoli et al., 2008). EWI-2wint

pourrait interférer avec la phosphorylation des protéines ERM et la polymérisation des filaments d'actine, potentiellement nécessaire au mécanisme d'entrée du VHC.

3. Caractérisation de la protéine EWI-2wint

La connaissance détaillée du processus par lequel EWI-2wint interagit avec CD81, de son interaction avec d'autres molécules du *tetraspanin web* ou des molécules impliquées dans des voies de signalisation est en effet nécessaire à la compréhension de sa fonction inhibitrice sur l'infection du VHC. Mais l'étude du mécanisme de production d'EWI-2wint, de sa biogenèse et de sa localisation subcellulaire est également essentielle. Il est important de déterminer par exemple pourquoi le clivage d'EWI-2 n'a pas lieu dans les hépatocytes. Une hypothèse serait l'absence d'expression de la protéase impliquée. Il est également possible que les hépatocytes produisent un inhibiteur de protéase qui bloque spécifiquement son activité. Dans ce sens, il est connu que les cellules produisent des inhibiteurs de protéases, notamment les hépatocytes, qui produisent par exemple des inhibiteurs de l'alpha-1-protéinase (Crowther et al., 2004; Parfrey et al., 2003). En sachant que le *tetraspanin web* est cellule- et tissu-spécifique, une autre possibilité serait que dans les cellules qui expriment EWI-2 mais pas EWI-2wint, le site de clivage d'EWI-2 ne serait pas accessible à la protéase, grâce au *tetraspanin web*. L'accessibilité à la protéase pourrait alors être modulée par d'autres composants du *tetraspanin web*, qui pourraient varier selon le type cellulaire (Boucheix and Rubinstein, 2001; Levy and Shoham, 2005b).

3.1. Clivage d'EWI-2 pour former EWI-2wint

Des analyses par mutagenèse dirigée nous ont permis d'identifier le site consensus de clivage dans la séquence d'EWI-2 qui est à l'origine d'EWI-2wint. Cependant, ce site consensus, RXR (où X est n'importe quel acide aminé), ne correspond à aucune protéase connue. De plus, des marquages métaboliques réalisés dans des cellules de hamster CHO indiquent que le clivage d'EWI-2 a lieu après la maturation de ses glycanes, indiquant que la protéase à l'origine d'EWI-2wint est probablement localisée dans l'appareil de Golgi.

Dans les cellules Huh-7, le motif RGRR reconnu par l'endopeptidase furine permet une production efficace d'EWI-2wint. Etant donné qu'EWI-2 peut être clivée au site RGR pour produire EWI-2wint, il est possible que la protéase clivant le site RXR soit une enzyme proche de la furine. L'enzyme furine est une sérine-protéase, appartenant à la famille des proprotéines convertases de type subtilisine (Hook et al., 1994; Nakayama, 1997; Taylor et al., 2003; Thomas, 2002), dont le site de clivage de référence, R-X-K/R-R, est différent de ceux des autres enzymes connues de la famille (Hook et al., 1994; Nakayama, 1997). Cependant, aucun de ces sites connus ne correspond à RXR. Plusieurs enzymes de cette famille, dont la furine, possèdent une distribution ubiquitaire (Hatsuzawa et al., 1990; Seidah

et al., 1991; Smeekens, 1993; Steiner et al., 1992). De plus, la furine est capable de cliver plusieurs protéines cellulaires, notamment neuroendocrines (Seidah et al., 1991; Smeekens, 1993; Steiner et al., 1992), et elle est présente dans le trans-Golgi, comme les autres protéines de cette famille. La furine est également présente à la surface cellulaire, où elle est responsable du clivage de toxines diphtérique et de l'anthrax, permettant leur activation (Nakayama, 1997). Certains substrats de ces enzymes sont spécifiques, alors que d'autres peuvent être clivés par les différentes proprotéines convertases (Taylor et al., 2003).

Des analyses supplémentaires avec des inhibiteurs de protéases et avec des ARN interférents devraient nous permettre d'identifier la protéase impliquée dans le clivage d'EWI-2 et responsable de la production d'EWI-2wint. Une autre famille de sérine-protéases, les chymotrypsines, pourraient également être impliquées. En effet, deux enzymes de cette famille, la tryptase beta et le composant activé du complément C1r, reconnaissent des sites de clivage proches du site consensus RXR : RNR et RQR, respectivement (Arlaud et al., 2002; Karlson et al., 2002). Toutefois, la séquence d'EWI-2 en amont d'EWI-2wint présente un site RGR.

3.2. Profil d'expression tissulaire et cellulaire d'EWI-2wint

Nous avons montré que certaines lignées cellulaires expriment EWI-2 et produisent EWI-2wint (Daudi, Ramos et A431), tandis que d'autres expriment EWI-2 sans production d'EWI-2wint (Lignées hépatocytaires, hépatocytes primaires, Molt-4, HEK-293T). D'autres encore n'expriment aucune de ces deux protéines à la surface (U937). En accord avec nos résultats, il a été montré que dans les cellules U937, EWI-2 n'atteint pas la membrane plasmique (Stipp et al., 2003a). Du fait de l'absence d'anticorps capables de reconnaître EWI-2wint, ces analyses d'expression d'EWI-2wint ont été réalisées par biotinylation de surface suivie de co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-CD81, dans des conditions de détergents qui gardent les complexes primaires intacts. Des protéines de 70kDa et 55kDa ont été identifiées comme EWI-2 et EWI-2wint, respectivement. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que d'autres protéines de la même taille aient été co-immunoprécipitées avec l'anti-CD81. De ce fait, nous tentons actuellement de produire des anticorps monoclonaux dirigés contre EWI-2 et EWI-2wint, qui nous permettront d'établir le profil d'expression tissulaire et cellulaire de ces protéines.

Par ailleurs, à l'aide de nos protéines taggées, nos résultats préliminaires indiquent que, dans les cellules CHO, EWI-2wint est notamment exprimée dans les endosomes, alors qu'EWI-2 est plutôt présente à la surface des cellules. L'utilisation de nos anticorps monoclonaux dirigés directement contre ces protéines nous permettront par la suite de confirmer ces résultats.

3.3. La voie de sécrétion et les modifications post-traductionnelles subies par EWI-2wint

Enfin, nous nous sommes intéressés au trafic intracellulaire d'EWI-2wint, ainsi qu'aux modifications post-traductionnelles subies par celle-ci. Il serait en effet intéressant de définir dans quel compartiment intracellulaire l'association entre EWI-2/EWI-2wint et CD81 a lieu. Stipp et collaborateurs ont montré que, dans les cellules U937, sans CD81, EWI-2 reste sous une forme immature sous-glycosylée dans le cytoplasme, avec des niveaux d'expression plus faibles (Stipp et al., 2003a). Les auteurs suggèrent que l'interaction entre EWI-2 et CD81 a lieu dans le RE/pré-Golgi (Stipp et al., 2003a). D'autre part, il a été montré que CD81 est également nécessaire à la maturation des glycanes d'une autre protéine partenaire, CD19, ainsi qu'à son expression à la surface (Shoham et al., 2006). De manière similaire, les tétraspanines UPIa et UPIb sont nécessaires pour la sortie de leurs partenaires UPII et UPIII du RE sous des formes hétérodimériques. UPIa est également importante pour le clivage protéolytique d'UPII par la furine dans le trans-Golgi. Sans UPIa, UPII est en effet dégradée par le proteasome (Hu et al., 2005).

Dans les cellules CHO, les profils de migration d'EWI-2 et d'EWI-2wint sont similaires lorsqu'EWI-2 est exprimée seule ou co-exprimée avec la CD81 humaine, cependant nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la CD81 d'hamster soit responsable de la maturation d'EWI-2 dans ces cellules. Toutefois, nos résultats préliminaires d'expression d'EWI-2 et EWI-2wint (par le clivage d'EWI-2 par la furine) indiquent que dans les cellules hépatocytaires Huh-7w7, qui n'expriment plus de CD81, EWI-2 et EWI-2wint n'ont pas besoin de CD81 comme chaperon pour être correctement maturées et exprimées à la surface cellulaire. De plus, le clivage d'EWI-2 pour former EWI-2wint, par l'enzyme furine, a lieu normalement en absence de CD81 dans les cellules Huh-7w7. Pour confirmer l'absence de rôle de CD81 dans la maturation d'EWI-2, il serait également intéressant d'utiliser une chimère CD81/CD82 qui n'interagit plus avec EWI-2/EWI-2wint dans le contexte cellulaire des Huh-7w7.

EWI-2 est une protéine présentant trois sites potentiels de N-glycosylation (NXS/T, où X est n'importe quel acide aminé sauf la proline), dans le premier, le troisième et le quatrième domaine Ig. EWI-2wint n'en possède donc que deux. Nous avons muté les sites des deux protéines et en effet ils sont tous N-glycosylés. La N-glycosylation d'EWI-2 n'est pas nécessaire à son clivage pour former EWI-2wint, cependant EWI-2 avec les trois sites mutés est une protéine instable, faiblement exprimée à la surface des cellules. Par ailleurs, la co-transfection des mutants de N-glycosylation d'EWI-2 avec CD81 indique que la N-glycosylation n'est pas nécessaire à l'interaction CD81/EWI-2, ni CD81/EWI-2wint. Par contre, les résultats indiquent qu'EWI-2wint exprimée directement pourrait ne pas subir certaines modifications post-traductionnelles. La séquence de ces protéines présente en

effet des sites potentiels de O-glycosylation et de palmitoylation. Les protéines EWI-2 et CD81 sont des protéines palmitoylées et, par exemple, la palmitoylation de CD9 bloque partiellement son accessibilité à EWI-2 (Yang et al., 2006). La mutation des sites de palmitoylation d'EWI-2/EWI-2wint et de CD81 serait nécessaire pour analyser leur influence sur les interactions entre ces protéines. Nos résultats préliminaires indiquent que CD81 avec tous ses sites de palmitoylation mutés interagit normalement avec EWI-2/EWI-2wint.

De manière générale, les tétraspanines favorisent l'export de leurs partenaires du RE, leur stabilité et leur présentation en surface (Hu et al., 2005). Cependant, EWI-2wint co-exprimée directement (sans EWI-2 comme intermédiaire) avec CD81 est une protéine instable qui n'arrive pas à la surface cellulaire. Des résultats similaires ont été obtenus lorsqu'elle est co-exprimée avec d'autres tétraspanines, telles CD9 et CD82, et avec la protéine SR-BI. Par contre, EWI-2wint co-exprimée avec le LDL-R arrive à la surface cellulaire. Des expériences supplémentaires avec des inhibiteurs de protéasome pourraient nous indiquer si EWI-2wint est dirigée vers une voie de dégradation. L'instabilité d'EWI-2wint exprimée directement, sans clivage préalable d'EWI-2 et sans co-expression avec CD81, est confirmée par le fait que les mutants de N-glycosylation d'EWI-2wint ne sont presque pas exprimés à la surface des CHO. De plus, comme cité précédemment, nous n'avons jamais réussi à la détecter lorsqu'elle était exprimée directement dans les cellules Huh-7.

4. L'impact du niveau d'expression de CD81 dans l'infection par le VHC

Durant ma thèse, nous avons également étudié l'impact du niveau d'expression de CD81 dans l'infection par le VHC. Cette analyse a été possible par l'observation que des VHCcc hautement infectieuses (Delgrange et al., 2007) avaient un effet cytopathique sur les cellules Huh-7. Néanmoins un certain nombre de cellules résistantes ont pu être isolées. Nous avons appelé cette population cellulaire R1, pour population résistante 1. Après traitement à l'IFN- α , une dilution limite de la population R1 a été réalisée permettant l'isolement de plusieurs clones cellulaires indépendants. La population R1 présentait des niveaux réduits d'infection par le VHC et les différents clones cellulaires indépendants présentaient des niveaux d'infection variables par les VHCcc. La transfection de ces différents clones cellulaires par de l'ARN viral indiquait que la synthèse des protéines virales et la réplication du génome n'étaient pas affectées dans la majorité des clones cellulaires, à l'exception du clone 6. De plus, l'assemblage et la sécrétion des nouvelles particules virales dans les différents clones cellulaires était équivalente aux cellules Huh-7 d'origine. L'analyse de leur niveau d'infection par les VHCpp nous a permis de montrer qu'en effet c'était l'étape de l'entrée virale qui était affectée dans ces différents clones. Afin de caractériser la variation observée dans cette étape du cycle, nous avons mesuré les niveaux d'expression de surface

des principales molécules jouant un rôle dans l'entrée virale : SR-BI, CLDN-1 et la tétraspanine CD81. De manière intéressante, les niveaux variables d'infection étaient directement corrélés aux niveaux d'expression de surface de CD81, alors que les expressions de SR-BI et CLDN-1, dans tous les clones indépendants et dans la population R1, étaient similaires aux cellules Huh-7. Des expériences de détection de l'expression totale de CD81 par western-blot indiquaient que ces cellules présentaient en effet des niveaux variables d'expression totale de la protéine.

Certains clones cellulaires, comme le clone 1, présentaient des niveaux intermédiaires d'expression de CD81 et d'infection par le VHC, entre les niveaux des Huh-7 d'origine et de la population R1. Le clone 6 présentait des niveaux d'expression de CD81 et d'infection par les VHCpp similaires aux cellules Huh-7. Cependant, l'étape de la réplication du génome était affectée, car le niveau d'infection par les VHCcc était réduit. Enfin, plusieurs clones, comme le clone 7, n'étaient pas infectables et présentaient des niveaux réduits ou indétectables de CD81. Nos résultats sont en accord avec deux études récentes sur l'importance des niveaux d'expression de CD81 à la surface des cellules pour leur susceptibilité à l'infection (Akazawa et al., 2007; Koutsoudakis et al., 2007). Plus spécifiquement, Koutsoudakis et collaborateurs ont suggéré qu'un niveau seuil d'expression de CD81 serait limitant pour permettre l'infection par le VHC et qu'à partir de ce seuil, la susceptibilité à l'infection augmente rapidement. Akazawa et collaborateurs ont également isolé plusieurs clones cellulaires indépendants issus de cellules Huh-7. Leurs clones cellulaires présentaient une grande hétérogénéité par rapport à la réplication de l'ARN viral, l'infectiosité et l'expression de CD81, mais de manière générale, les clones qui n'exprimaient pas de CD81 n'étaient pas infectables.

Il a été montré que les tétraspanines CD81, CD9 et CD82 ne sont pas exprimées dans de multiples lignées de myélomes. Cela est lié au fait que les régions des promoteurs de ces tétraspanines sont hyperméthylées, occasionnant des niveaux réduits de leur ARN messagers. La dé-méthylation des promoteurs et la dé-acétylation des histones par les drogues 5-aza-deoxycytidine (inhibiteur de l'ADN méthyltransférase) et trichostatine A (inhibiteur de l'histone déacétylase) permettent la ré-expression de CD82 (Drucker et al., 2006). Dans notre étude, nous avons tenté de traiter les clones R1 qui n'expriment plus de CD81 par ces drogues. Néanmoins, ce type de traitement n'a pas permis de restaurer les niveaux d'expression de CD81 et d'infection par le VHC. La raison pour laquelle l'expression de CD81 est modulée dans les différents clones cellulaires indépendants reste à déterminer. Etant donné que dans les cellules Huh-7 d'origine les niveaux d'expression de CD81 sont élevés et que la population R1 a été sélectionnée suite à l'infection de cellules Huh-7 par des VHCcc hautement infectieuses, il serait possible que, dans la population de cellules Huh-7,

des cellules exprimant des niveaux réduits du facteur d'entrée virale CD81 aient été sélectionnées par l'infection virale.

De manière intéressante, nous avons isolé un clone cellulaire, le clone 7, qui n'exprimait plus de CD81 et qui était résistant à l'infection par le VHC. Ces cellules ont été appelées Huh-7w7 et sont un outil essentiel à l'étude du cycle viral. En effet, nos résultats indiquent que, bien que l'étape d'entrée soit bloquée, ces cellules répliquent le génome normalement après transfection de l'ARN viral. L'assemblage et la sécrétion de nouvelles particules virales a également lieu. Ces cellules permettront donc l'étude détaillée des étapes de réplication et d'assemblage du VHC. Le fait que CD81 soit enrichi dans les exosomes (Escola et al., 1998), que les hépatocytes sécrètent ces vésicules (Thery et al., 2002) et que la co-expression de hCD81 et E1E2 dans les cellules CHO permette l'expression d'une fraction des glycoprotéines virales dans les exosomes pourraient indiquer que CD81 jouerait un rôle dans l'assemblage des particules virales (Masciopinto et al., 2004). Toutefois, nos résultats avec les cellules hépatocytaires Huh-7w7 transfectées avec l'ARN viral suggèrent que CD81 joue un rôle uniquement dans l'étape d'entrée du VHC.

De plus, à l'aide des cellules Huh-7w7, il serait possible de déterminer les résidus de CD81 importants pour l'interaction avec la glycoprotéine virale E2 dans un contexte cellulaire hépatocytaire. Comme cité dans l'introduction, des études récentes ont montré l'importance de l'expression de CD81 entière dans un contexte cellulaire hépatique à l'opposé de l'utilisation de formes solubles de CD81 ou d'autres types cellulaires (Drummer et al., 2005; Flint et al., 2006). L'étude de Flint et collaborateurs a montré que l'expression de la CD81 de différentes espèces dans les cellules HepG2 permet de les rendre permissives à l'infection (Flint et al., 2006). Toutefois, cette lignée hépatocytaire est difficile à manipuler et surtout peu permissive à la réplication des VHCcc. Il serait donc intéressant d'exprimer, dans les cellules hépatocytaires Huh-7w7, des protéines chimériques entre CD81 et la tétraspanine la plus proche, CD9, qui ne joue pas un rôle dans l'infection du VHC, comme montré par Zhang et collaborateurs (Zhang et al., 2004a). D'autre part, il serait également possible d'utiliser les cellules Huh-7w7 pour analyser les domaines et résidus de CD81 impliqués dans l'interaction avec EWI-2wint, dans un contexte cellulaire humain. Ces cellules seront également utiles pour l'étude de CD81 en elle-même. Il serait par exemple possible d'analyser les voies de signalisation induites par cette tétraspanine, étudier si ces voies sont importantes pour l'infection du VHC et si elles sont inhibées par EWI-2wint.

Dans notre travail, nous avons confirmé, à l'aide des cellules Huh-7w7, que l'absence d'infection était strictement liée à une absence d'expression de CD81. En effet, l'expression ectopique de la CD81 humaine (hCD81) dans les cellules Huh-7w7 (Huh-7w7/hCD81) permet de restaurer la permissivité aux VHCcc et aux VHCpp de tous les génotypes testés.

Ces résultats indiquent que l'entrée virale est modulée par les niveaux d'expression de CD81 à la surface des cellules.

5. L'entrée du VHC, la composition lipidique membranaire et CD81 associée aux TEM

Récemment, Flint et collaborateurs ont montré que l'expression, dans les cellules hépatocytaires humaines HepG2, de CD81 issue de différentes espèces permet de les rendre permissives à l'infection par le VHC (Flint et al., 2006). Cette étude a montré que CD81 issue de primates, mais également de rongeurs, est capable de permettre l'infection virale. Plus spécifiquement, il ont montré que CD81 d'origine murine (mCD81) rends les HepG2 permissives aux VHCpp et VHCcc. Plus spécifiquement, cette étude montrait que ces cellules sont plus permissives aux VHCpp de génotype 1a que celles de génotype 2a (Flint et al., 2006). Par contre, ce même type cellulaire (des HepG2 exprimant la mCD81) n'était pas permissif aux VHCpp-1a dans l'étude de Bertaux & Dragic (Bertaux and Dragic, 2006). Dans notre travail, l'expression ectopique de mCD81 dans les cellules Huh-7w7 (Huh-7w7/mCD81) a également permis de restaurer l'infection par les VHCcc et les VHCpp, notamment celles des génotypes 2a et 4. Néanmoins, comme Flint et collaborateurs (Flint et al., 2006), les niveaux d'infection sur les Huh-7w7/mCD81 étaient inférieurs à ceux des Huh-7w7/hCD81. En effet, CD81 issue de différents rongeurs était capable de rendre les HepG2 permissives à l'infection, mais avec de niveaux réduits en comparaison aux CD81 de primates (Flint et al., 2006). Ensemble, ces résultats indiquent que CD81 n'est pas le déterminant de la spécificité d'espèce.

L'observation intéressante que les cellules Huh-7w7/mCD81 soient permissives à l'infection par le VHC nous a permis d'analyser le rôle de CD81 associée au *tetraspanin web* dans l'infection virale. Récemment, Silvie et collaborateurs ont généré deux anticorps monoclonaux dirigés contre la mCD81, MT81 et MT81w (Silvie et al., 2006a). L'anticorps MT81 reconnaît la population globale de mCD81 dans les cellules, alors que l'anticorps MT81w ne reconnaît mCD81 que lorsqu'elle est associée au *tetraspanin web*. Silvie et collaborateurs ont montré que, dans les cellules hépatocytaires de souris Hepa1-6, 60% de la mCD81 est associée aux TEM (détectée par le MT81w) (Silvie et al., 2006a). Nos données indiquent que, dans les cellules Huh-7w7/mCD81, le pourcentage de mCD81 associée au *tetraspanin web* est plus faible, de l'ordre de 30%. De plus, la mCD81 est capable d'interagir avec des partenaires dans un contexte cellulaire humain, notamment avec EWI-2. Ainsi, nous avons utilisé ces anticorps afin d'évaluer le rôle de la CD81 murine associée aux TEM dans l'entrée virale. Un tel outil n'existe pas pour la détection de CD81 humaine associée aux TEM.

L'anticorps MT81 est capable de neutraliser l'entrée du VHC dans les cellules Huh-7w7/mCD81, alors que l'anticorps MT81w inhibe peu l'infection, même à des concentrations très élevées. Ces résultats de neutralisation suggèrent que CD81 associée aux TEM ne joue pas un rôle majeur dans l'entrée du VHC. Nos données sont différentes de celles publiées par Silvie et collaborateurs sur le rôle de CD81 dans l'infection du parasite qui cause le paludisme, le *Plasmodium*. Dans leur étude, Silvie et collaborateurs ont montré que les deux anticorps, MT81 et MT81w, étaient capables de neutraliser l'infection du parasite des rongeurs, *Plasmodium yoelii*, dans les cellules Hepa1-6 (Silvie et al., 2006a). Nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'épitope de CD81 reconnu par l'anticorps MT81w ne participe pas à l'interaction avec le VHC, ni que l'inhibition partielle de cet anticorps soit le reflet d'une reconnaissance partielle de CD81 associée aux TEM.

Afin de confirmer l'absence de rôle de CD81 associée aux TEM dans l'infection par le VHC, nous avons utilisé la M β CD, qui extrait le cholestérol membranaire. Il a été montré que le traitement des cellules avec la M β CD inhibe l'entrée virale et que le réapprovisionnement des cellules en cholestérol après le traitement avec la M β CD permet de restaurer l'infection par le VHC (Kapadia et al., 2007). Nos résultats confirment l'importance du cholestérol pour l'entrée virale. En effet, la M β CD inhibe l'infection du VHC dans les cellules Huh-7 et Huh-7w7/mCD81 de manière dose dépendante. Le réapprovisionnement des cellules en cholestérol après le traitement avec la M β CD permet de restaurer les niveaux d'infection par le VHC dans les deux types cellulaires analysés. Par contre, ils sont similaires entre les cellules enrichies avec du cholestérol en comparaison aux cellules non traitées. Kapadia et collaborateurs ont montré que l'inhibition de l'entrée virale induite par le traitement des cellules avec la M β CD est liée à une diminution de l'expression de CD81 à la surface des cellules et que le réapprovisionnement des cellules en cholestérol après le traitement avec la M β CD permet de restaurer les niveaux d'expression de CD81 à la surface (Kapadia et al., 2007). CD81 est en effet associée au cholestérol membranaire (Charrin et al., 2003c). En accord avec ces résultats, le traitement avec la M β CD des cellules Huh-7w7/mCD81 diminue la quantité totale de mCD81 et le réapprovisionnement des cellules en cholestérol restaure les niveaux d'expression. Par contre, la réduction de hCD81 dans les cellules Huh-7 suite au traitement avec la M β CD n'est pas significative, indiquant que dans ces cellules l'inhibition de l'infection serait plutôt liée à une diminution de la concentration en cholestérol dans la membrane plasmique.

De manière intéressante, le marquage de mCD81 associée au *tetraspanin web* (détecté par l'anticorps MT81w) après traitement des cellules Huh-7w7/mCD81 avec la M β CD ne varie pas. Alors que ce traitement inhibe l'infection par le VHC. Ces résultats confirment que la CD81 associée aux TEM ne participe pas à l'infection par le VHC. Le

réapprovisionnement de cellules Huh-7w7/mCD81 en cholestérol après le traitement avec la M β CD n'a également pas d'effet sur CD81 associée aux TEM, alors que l'enrichissement des cellules en cholestérol augmente le marquage de l'anticorps MT81w. Nos résultats sont néanmoins différents de ceux publiés pour l'infection hépatique de *Plasmodium*. En effet, Silvie et collaborateurs ont montré que le traitement des Hepa1-6 avec la M β CD diminue uniquement le marquage de MT81w, sans altérer celui de MT81. De même, le réapprovisionnement des cellules en cholestérol ou leur enrichissement avec du cholestérol induit l'augmentation de CD81 associée au *tetraspanin webs*, sans faire varier les niveaux totaux de CD81 (Silvie et al., 2006a). Les différences entre nos travaux pourraient être dues au fait que dans notre étude la mCD81 est exprimée dans un contexte cellulaire humain et non murin. Bien que les Hepa1-6 soient également des hépatocytes, ils appartiennent à une autre espèce, leurs *tetraspanin web* pourraient alors être différents. Dans ce sens, les cellules Hepa1-6 expriment la tétraspanine CD9, tandis que cette protéine n'est pas présente dans les cellules Huh-7, ni dans les cellules Huh-7w7. De plus, CD9 joue un rôle dans la reconnaissance de mCD81 par l'anticorps MT81w (Silvie et al., 2006a). La reconnaissance de mCD81 dans le contexte cellulaire des Huh-7w7 pourrait alors être différente. Par ailleurs, CD81 est importante pour l'infection hépatique du *Plasmodium*, mais elle n'est pas responsable directement de l'entrée du parasite, puisqu'aucune interaction directe entre CD81 et *Plasmodium* n'a pu être démontrée jusqu'à présent. Les différentes études de Silvie et collaborateurs suggèrent qu'une protéine partenaire de CD81 pourrait être responsable de l'entrée du parasite dans les hépatocytes (Silvie et al., 2006a; Silvie et al., 2006b; Silvie et al., 2003), en accord avec le rôle de CD81 associée aux TEM dans l'infection parasitaire. A l'inverse, CD81 en elle-même est essentielle à l'entrée du VHC dans les hépatocytes. Elle interagit physiquement avec la glycoprotéine virale E2. Ces différences pourraient expliquer les différents rôles de CD81 associée aux *tetraspanin web* observées entre les mécanismes d'infection hépatiques du VHC et du *Plasmodium*.

Le fait que CD81 associée aux TEM ne participe pas à l'infection du VHC a été confirmé également par le traitement des cellules Huh-7w7/mCD81 avec la sphingomyélinase (Smase). Il a été montré que le traitement de cellules Huh-7 avec cette enzyme, qui transforme les sphingomyélines de la membrane plasmique en céramides, inhibe l'entrée du VHC dans les cellules, en induisant l'internalisation de CD81 (Voisset et al., 2007). De manière similaire, dans notre étude, le traitement des cellules Huh-7 et Huh-7w7/mCD81 avec la Smase réduit l'infection par des VHCcc et VHCpp. Les niveaux d'expression de CD81 sont réduits dans les Huh-7 traitées, alors que ceux de la tétraspanine CD151 ne sont pas affectés, indiquant que les effets sont spécifiques de CD81. De manière intéressante, le traitement Smase des cellules Huh-7w7/mCD81 réduit également la quantité

de mCD81 totale, détectée par l'anticorps MT81. Par contre, la quantité de mCD81 associée aux TEM augmente par rapport aux cellules non traitées. La transformation des sphingomyélines en céramides à la membrane plasmique induit à la fois l'inhibition de l'entrée du VHC et l'internalisation de CD81 et la relocalisation de la CD81 restante vers le *tetraspanin web*. Il serait alors possible que les céramides fassent partie de la composition de TEM. L'inhibition de l'infection par la Smase pourrait alors se faire par une relocalisation de CD81 vers ce domaine. Une autre hypothèse serait que la quantité globale de CD81 pourrait être réduite à des niveaux inférieurs au seuil nécessaire pour que l'infection ait lieu. L'enrichissement de la membrane en céramides pourrait également induire le rassemblement (*clustering*) de CD81, augmentant la reconnaissance de l'anticorps MT81_w. Cet anticorps pourrait également reconnaître un épitope de CD81 qui serait plus exposé suite à l'enrichissement de la membrane en céramides.

La palmitoylation est une modification post-traductionnelle des tétraspanines qui joue un rôle important dans l'organisation des TEM. Bertaux et collaborateurs ont montré qu'un mutant de CD81 avec ses sites de palmitoylation absents est capable de permettre l'infection par les VHCpp (Bertaux and Dragic, 2006). Leurs résultats indiquent que CD81 est capable de permettre l'infection même sans interagir avec le *tetraspanin web*. En accord avec ces résultats, nous avons montré que CD81 associée aux TEM ne participe pas à l'infection par le VHC. Nous avons également montré que le partenaire de CD81, EWI-2wint, présent dans certaines lignées cellulaires et absent des hépatocytes, bloque l'entrée du virus. A l'aide des cellules Huh-7w7/mCD81 et des anticorps dirigés contre la mCD81, MT81 et MT81_w, il serait intéressant d'analyser si l'inhibition de l'entrée induite par EWI-2wint est médiée par une relocalisation de CD81 vers les TEM. Dans ce sens, EWI-2 provoque une réorganisation des complexes à tétraspanines à la surface des cellules, avec redistribution de CD81 vers les filipodes (Stipp et al., 2003a) et modification de la reconnaissance de CD81 par certains anticorps (Kolesnikova et al., 2004). Nos résultats préliminaires indiquent que lorsqu'EWI-2, avec le site de clivage de la furine, est exprimée de manière transitoire dans les cellules Huh-7w7/mCD81, EWI-2 et EWI-2wint sont co-immunoprécipitées par les anticorps MT81 et MT81_w. Des expériences supplémentaires seront réalisées avec des lignées Huh-7w7 co-exprimant de façon stable EWI-2wint et mCD81. De manière intéressante, le partenaire de CD81, EWI-F, module négativement l'infection hépatique du *Plasmodium*. Par contre, ce rôle inhibiteur d'EWI-F ne semble pas lié à une interaction directe entre EWI-F et le parasite, car des anticorps anti-EWI-F et une forme recombinante soluble d'EWI-F n'ont aucune action sur l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii*. La surexpression d'EWI-F induit une diminution du ratio MT81_w/MT81 dans les cellules Hepa1-6, suggérant qu'elle entre en compétition pour l'association à CD81 avec une autre protéine associée à CD81, qui jouerait un rôle essentiel

au cours de l'infection du *Plasmodium* (Silvie O., Abache T., Billard M., Franetich J.-F., Hannoun L., van Germert G.-J., Luty A., Boucheix C., Mazier D. and Rubinstein E., *The CD81 molecular partner EWI-F exerts a negative effect on host cell infection by Plasmodium yoelii sporozoites*, thèse de doctorat de l'Université de Paris 6 présentée par Olivier Silvie le 26 janvier 2006 ; <http://cybertheses.francophonie.org>). Bien que cette étude ait montré qu'EWI-2 ne semble pas jouer un rôle de récepteur pour *Plasmodium*, ni être impliquée au cours de l'infection, il serait intéressant d'analyser si l'expression d'EWI-2 dans les hépatocytes pourrait inhiber l'entrée des sporozoïtes de *Plasmodium*.

6. Hypothèses pour l'entrée du VHC

Le mécanisme d'entrée du VHC dans ses cellules cibles n'est pas encore complètement établi. Les données obtenues jusqu'à présent par les différents groupes indiquent que l'attachement du virus à la surface des cellules serait médié par les GAG et le LDL-R. Le virus interagirait avec SR-BI, CD81 et ensuite avec les CLDN, ce qui induirait les événements conduisant à l'internalisation du complexe virus-récepteur et à la fusion des membranes virales et cellulaires. CD81 pourrait d'ailleurs contribuer aux phénomènes de remaniements membranaires conduisant à la fusion de ces membranes.

La composition lipidique membranaire est extrêmement importante pour l'entrée virale, notamment la teneur en cholestérol. Nous avons montré que le traitement des cellules avec la M β CD réduit la quantité de CD81 à la surface, mais augmente la quantité de SR-BI, en accord avec les résultats de Kapadia et collaborateurs (Kapadia et al., 2007). Dans leur étude, Kapadia et collaborateurs suggèrent que le rôle de SR-BI serait secondaire par rapport à celui de CD81, ou que leurs niveaux d'expression nécessaires pour que l'infection ait lieu seraient différents (Kapadia et al., 2007). Toutefois, il est important de noter que la distribution du cholestérol dans les membranes est très dynamique (Lange and Steck, 1998) et que CD81 et SR-BI pourraient être présentes dans différents domaines lipidiques membranaires. En effet, le traitement des cellules avec la Smase, qui diminue la quantité de CD81, n'a pas d'effet sur l'expression de SR-BI à la surface, en accord avec Voisset et collaborateurs (Voisset et al., 2007). Etant donné que la Smase diminue la quantité de sphingomyélines à la membrane plasmique, CD81 serait plutôt présente dans les domaines riches en sphingolipides. SR-BI serait quand à elle plutôt présente dans les domaines riches en phospholipides (Adachi and Tsujimoto, 2006).

Des facteurs cellulaires et des facteurs présents dans le sérum, notamment des lipoprotéines, modèleraient l'entrée du VHC. Le rôle des lipides dans l'infection a été suggéré notamment par l'association des particules virales avec les LDL et VLDL dans le sérum des patients (Andre et al., 2002). Les particules virales ainsi dotées de facteurs cellulaires pourraient s'attacher en premier lieu à des récepteurs ayant une affinité pour ces

différentes molécules, tels que l'héparane sulfate, le LDL-R et SR-BI. L'interaction des lipoprotéines avec leur récepteur pourrait libérer les glycoprotéines d'enveloppe, permettant l'interaction de E2 avec CD81 (**Figure 30**).

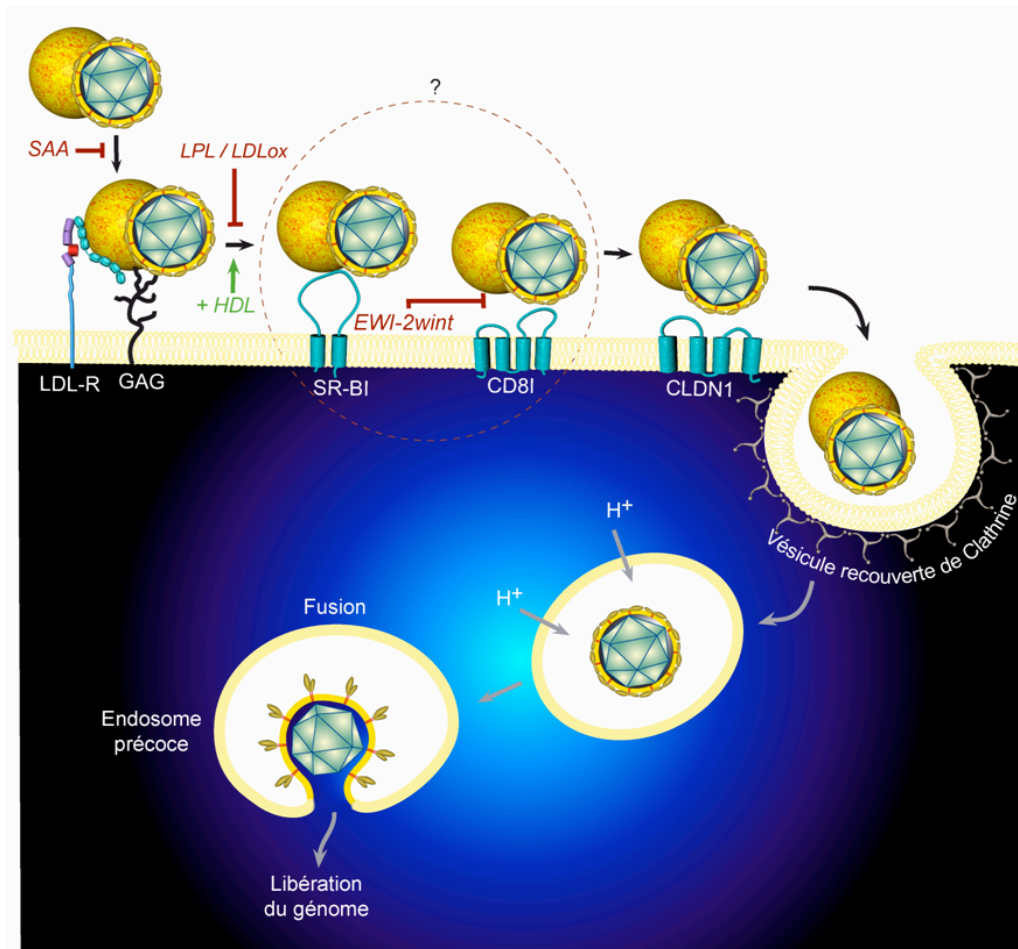


Figure 30. Représentation schématique de l'entrée du VHC dans ses cellules cibles avec les molécules influençant l'entrée virale.

Différentes molécules présentes dans le sérum sont capables de moduler l'entrée du VHC. C'est le cas des HDL, qui facilitent l'entrée, des LDL oxydées, de la LPL et de la SAA, qui inhibent cette même étape. Le partenaire de CD81, EWI-2wint, est exprimé dans certaines lignées cellulaires et bloque l'entrée du VHC.

Il a été montré que les LDL oxydées inhibent l'entrée (von Hahn et al., 2006), alors que les HDL augmentent l'infection virale (Bartosch et al., 2005; Dreux et al., 2006; Voisset et al., 2005) (**Figure 30**). Tous les deux agissent à une étape dépendante de SR-BI, molécule qui participe au transfert lipidique entre les cellules et le milieu extracellulaire. Une autre lipoprotéine capable d'inhiber l'infection est la LPL, qui permet une interaction indirecte entre le VHC et les GAG (Andreo et al., 2007) (**Figure 30**). De plus, la SAA, apolipoprotéine produite dans le foie pendant une inflammation, inhibe l'entrée en interagissant avec les particules virales (Cai et al., 2007; Lavie et al., 2006) (**Figure 30**). D'autre part, de manière originale, nous avons montré que l'entrée du VHC est également modulée par le partenaire

de CD81, EWI-2wint. Cette protéine, présente dans certaines lignées cellulaires et absente des hépatocytes, est capable de bloquer l'infection virale (**Figure 30**).

Les hépatocytes étant des cellules polarisées, il n'est pas encore connu si l'endocytose du virus a lieu au pôle basolatéral, en contact avec les capillaires sinusoides, ou au pôle apical, en contact avec les canalicules biliaires (**Figure 31**).

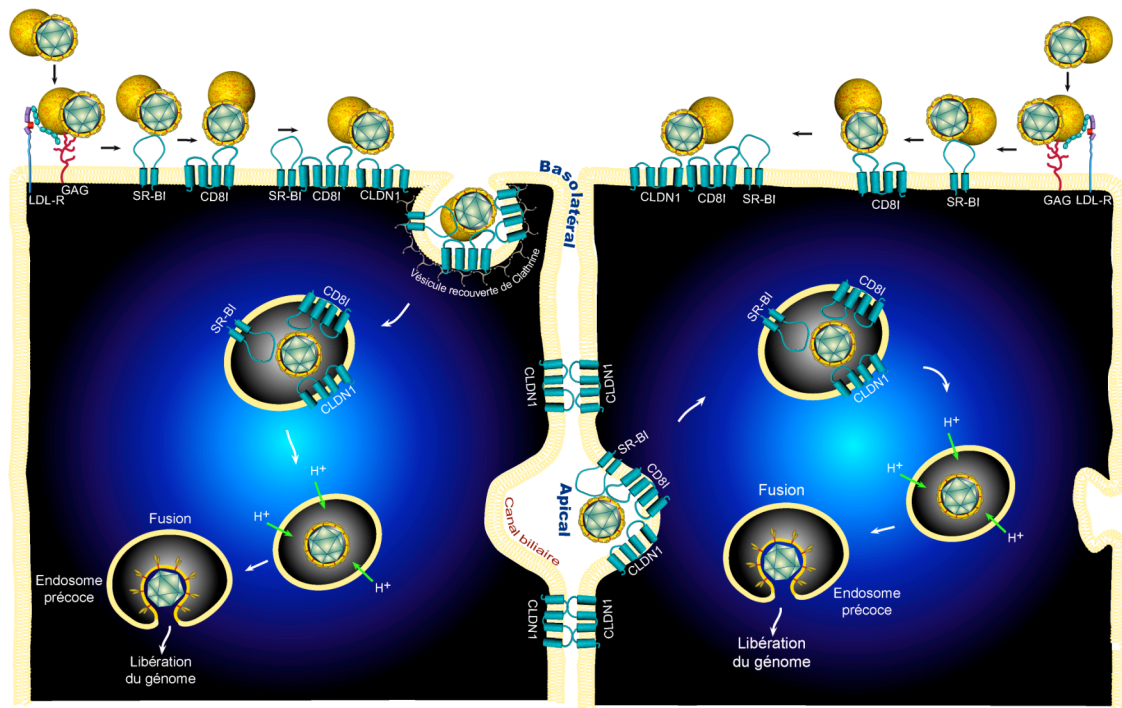


Figure 31. Représentation schématique de l'entrée du VHC dans les hépatocytes polarisés.

Deux hypothèses pour expliquer le mécanisme d'entrée du VHC dans les hépatocytes, des cellules polarisées. L'attachement du VHC au pôle basolatéral des cellules se fait via son interaction avec le LDL-R et les GAG, ensuite le virus interagit avec les molécules d'entrée SR-BI et CD81, et est transféré vers les régions de membrane riches en CLDN, pour ensuite être internalisé par des vésicules recouvertes de clathrine vers les endosomes précoces, où le pH acide déclenche le processus de fusion. Une autre hypothèse serait que lors de son interaction avec les CLDN, le virus est dirigé vers le pôle apical des cellules, où l'endocytose aurait lieu.

Une fois le complexe virus-récepteurs formé à la surface basolatérale des hépatocytes, il pourrait être relocalisé au niveau des jonctions serrées, qui délimitent les surfaces apicale et baso-latérale, où l'endocytose dépendante de la clathrine pourrait être induite (**Figure 31, panel de droite**). Dans ce sens, il a été montré que les VHCpp infectent préférentiellement les cellules polarisées Caco-2 par leur surface apicale (Mee et al., 2008). Dans certaines lignées cellulaires mobiles, les tétraspanines sont localisées au niveau des jonctions serrées (Yanez-Mo et al., 1998) et il est connu que CD81 est capable de relocaliser des complexes membranaires à la surface des cellules. La relocalisation du complexe virus-récepteurs vers la surface apicale pourrait alors être induite par CD81. Dans ce sens, des

drogues qui déstabilisent l'actine, comme la latrunculine A, bloquent la relocalisation de complexes E2/CD81 vers les régions de contacts entre les cellules hépatocytaires et réduisent l'infectiosité des VHCcc (Brazzoli et al., 2008). De plus, la dissociation des structures de type jonctions serrées de cellules Huh-7 diminue les niveaux d'infection par le VHC, indiquant que ces structures sont importantes pour l'entrée virale (Brazzoli et al., 2008).

La relocalisation du complexe virus-récepteurs a déjà été observé pour le coxsackievirus B. En effet, ce virus interagit avec le facteur accélérateur de la dissociation (DAF, de l'anglais *decay accelerating factor*) au niveau de la face apicale de ses cellules cibles, ensuite il est latéralement acheminé jusqu'aux jonctions serrées. Ce virus induit une dissociation des jonctions serrées de manière à pouvoir interagir avec la protéine CAR qui se trouve du côté basolatéral des jonctions (Coyne and Bergelson, 2006). A l'inverse du VHC, le coxsackievirus B entre en contact avec ses cellules cibles par la surface apicale, alors que le récepteur CAR se trouve à la surface basolatérale. Toutefois, pour le VHC, le contact avec les hépatocytes se fait par la surface basolatérale, qui présente tous les récepteurs connus nécessaires à son internalisation. Par ailleurs, les études qui suggèrent une entrée virale par le pôle apical ont été réalisées en culture cellulaire, cependant la polarisation des hépatocytes dans le foie n'est probablement pas la même que celle des lignées hépatocytaires en culture. De plus, la question persiste si le virus serait capable de survivre à la bile si son internalisation se faisait au pôle apical des hépatocytes.

L'internalisation du VHC pourrait alors se faire au pôle basolatéral (**Figure 31, panel de gauche**). Dans ce sens, il a été montré que l'expression de CD81, SR-BI et CLDN-1 est plus importante à la surface basolatérale des cellules Caco-2 polarisées (Mee et al., 2008), et qu'un mutant de CLDN-1, qui n'est plus capable d'interagir avec les autres protéines des jonctions serrées, est toujours capable de restaurer de l'infectivité (Harris et al., 2008). Ceci indique que la formation des jonctions serrées n'est pas essentielle à l'entrée virale. Ce mutant est également capable de s'associer à CD81 (Harris et al., 2008), et la CLDN-1 s'associe aux tétraspanines CD9, CD81 et CD151 en dehors des jonctions serrées (Kovalenko et al., 2007). Ensemble, ces données pourraient suggérer que l'entrée virale est médiée par la CLDN-1 présente dans le *tetraspanin web* et interagissant avec CD81. Toutefois, nous avons montré que CD81 associée aux microdomaines enrichis en tétraspanines ne jouent pas un rôle majeur dans l'entrée virale. L'entrée du VHC serait plutôt médiée par des molécules de CD81 qui ne sont pas associées au *tetraspanin web*. La population de CD81 conférant la permissivité au VHC pourrait être déjà associée aux autres molécules jouant un rôle dans l'entrée virale, notamment la CLDN-1, en dehors des TEM, ou ces associations pourraient être induites suite à l'interaction avec le virus.

Conclusion

Dans notre travail, nous avons montré que le niveau d'expression de CD81 à la surface des cellules est limitant pour l'infection du VHC et que des niveaux variables d'expression de CD81 sont corrélés à des niveaux variables d'infection virale. De plus, nous avons isolé un clone cellulaire humain, appelé Huh-7w7, qui n'exprime plus de hCD81. L'expression ectopique de CD81 murine dans ces cellules nous a permis de démontrer que la population de CD81 responsable de l'entrée du VHC n'est pas associée aux microdomaines enrichis en tétraspanines.

Plusieurs molécules semblent impliquées dans le mécanisme d'entrée du VHC. Néanmoins, celles-ci ne sont pas suffisantes pour conférer l'hépatotropisme de ce virus. Nous avons fait l'observation originale que certaines lignées cellulaires expriment EWI-2wint, un partenaire de CD81 capable de bloquer l'entrée du VHC. Par contre, les hépatocytes ne l'expriment pas. Sur base de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'hépatotropisme du VHC ne serait pas lié uniquement à la présence d'un récepteur ou co-récepteur spécifique présent au niveau des hépatocytes, mais également à l'absence d'un inhibiteur spécifique, EWI-2wint, au niveau de ces cellules. Cette observation nous permet d'envisager qu'un tel mécanisme pourrait également réguler l'entrée d'autres pathogènes dans leur cellules cibles.

Conclusion

Bibliographie

- Abache, T., Le Naour, F., Planchon, S., Harper, F., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2007) The transferrin receptor and the tetraspanin web molecules CD9, CD81, and CD9P-1 are differentially sorted into exosomes after TPA treatment of K562 cells. *J Cell Biochem*, **102**, 650-664.
- Accapezzato, D., Francavilla, V., Rawson, P., Cerino, A., Cividini, A., Mondelli, M.U. and Barnaba, V. (2004) Subversion of effector CD8+ T cell differentiation in acute hepatitis C virus infection: the role of the virus. *Eur J Immunol*, **34**, 438-446.
- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H. and Krieger, M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, **271**, 518-520.
- Adachi, H. and Tsujimoto, M. (2006) Endothelial scavenger receptors. *Prog Lipid Res*, **45**, 379-404.
- Adachi, M., Taki, T., Konishi, T., Huang, C.I., Higashiyama, M. and Miyake, M. (1998) Novel staging protocol for non-small-cell lung cancers according to MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 gene expression. *J Clin Oncol*, **16**, 1397-1406.
- Adeli, K. (1994) Regulated intracellular degradation of apolipoprotein B in semipermeable HepG2 cells. *J Biol Chem*, **269**, 9166-9175.
- Agnello, V. and Abel, G. (1997) Localization of hepatitis C virus in cutaneous vasculitic lesions in patients with type II cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum*, **40**, 2007-2015.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B. and Zhang, Q.X. (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12766-12771.
- Aijaz, S., Balda, M.S. and Matter, K. (2006) Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol*, **248**, 261-298.
- Aizaki, H., Nagamori, S., Matsuda, M., Kawakami, H., Hashimoto, O., Ishiko, H., Kawada, M., Matsuura, T., Hasumura, S., Matsuura, Y., Suzuki, T. and Miyamura, T. (2003) Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology*, **314**, 16-25.
- Akazawa, D., Date, T., Morikawa, K., Murayama, A., Miyamoto, M., Kaga, M., Barth, H., Baumert, T.F., Dubuisson, J. and Wakita, T. (2007) CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *J Virol*, **81**, 5036-5045.
- Allander, T., Forns, X., Emerson, S.U., Purcell, R.H. and Bukh, J. (2000) Hepatitis C virus envelope protein E2 binds to CD81 of tamarins. *Virology*, **277**, 358-367.
- Allez, M., Brimnes, J., Dotan, I. and Mayer, L. (2002) Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, **123**, 1516-1526.
- Alter, H.J., Purcell, R.H., Holland, P.V. and Popper, H. (1978a) Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, **1**, 459-463.
- Alter, H.J., Tabor, E., Meryman, H.T., Hoofnagle, J.H., Kahn, R.A., Holland, P.V., Gerety, R.J. and Barker, L.F. (1978b) Transmission of hepatitis V virus infection by transfusion of frozen-deglycerolized red blood cells. *N Engl J Med*, **298**, 637-642.
- Amieva, M.R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L.S., Nelson, W.J. and Falkow, S. (2003) Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*, **300**, 1430-1434.
- Anderson, J.C., Simonetti, J., Fisher, D.G., Williams, J., Yamamura, Y., Rodriguez, N., Sullivan, D.G., Gretch, D.R., McMahon, B. and Williams, K.J. (2003) Comparison of different HCV viral load and genotyping assays. *J Clin Virol*, **28**, 27-37.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G. and Lotteau, V. (2002) Characterization of low-

- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol*, **76**, 6919-6928.
- Andreo, U., Maillard, P., Kalinina, O., Walic, M., Meurs, E., Martinot, M., Marcellin, P. and Budkowska, A. (2007) Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell Microbiol*, **9**, 2445-2456.
- Andria, M.L., Barsh, G.S. and Levy, S. (1992) Expression of TAPA-1 in preimplantation mouse embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, **186**, 1201-1206.
- Ang, J., Lijovic, M., Ashman, L.K., Kan, K. and Frauman, A.G. (2004) CD151 protein expression predicts the clinical outcome of low-grade primary prostate cancer better than histologic grading: a new prognostic indicator? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **13**, 1717-1721.
- Anumanthan, A., Bensussan, A., Boumsell, L., Christ, A.D., Blumberg, R.S., Voss, S.D., Patel, A.T., Robertson, M.J., Nadler, L.M. and Freeman, G.J. (1998) Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol*, **161**, 2780-2790.
- Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., Little, S., Havlir, D.V., Richman, D.D., Gruener, N., Pape, G., Waters, A., Easterbrook, P., Salio, M., Cerundolo, V., McMichael, A.J. and Rowland-Jones, S.L. (2002) Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*, **8**, 379-385.
- Appel, N., Pietschmann, T. and Bartenschlager, R. (2005) Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol*, **79**, 3187-3194.
- Appel, N., Schaller, T., Penin, F. and Bartenschlager, R. (2006) From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem*, **281**, 9833-9836.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U. and Bartenschlager, R. (2008) Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog*, **4**, e1000035.
- Arlaud, G.J., Gaboriaud, C., Garnier, G., Circolo, A., Thielens, N.M., Budayova-Spano, M., Fontecilla-Camps, J.C. and Volanakis, J.E. (2002) Structure, function and molecular genetics of human and murine C1r. *Immunobiology*, **205**, 365-382.
- Asselah, T., Rubbia-Brandt, L., Marcellin, P. and Negro, F. (2006) Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut*, **55**, 123-130.
- Baek, K.H., Park, H.Y., Kang, C.M., Kim, S.J., Jeong, S.J., Hong, E.K., Park, J.W., Sung, Y.C., Suzuki, T., Kim, C.M. and Lee, C.W. (2006) Overexpression of hepatitis C virus NS5A protein induces chromosome instability via mitotic cell cycle dysregulation. *J Mol Biol*, **359**, 22-34.
- Bagot, M., Martinel, I., Charue, D., Boulland, M.L., Wechsler, J., Bensussan, A. and Boumsell, L. (1997a) Functional role of CD101 on skin dendritic cells. *Adv Exp Med Biol*, **417**, 227-232.
- Bagot, M., Martinel, I., Charue, D., Weill, F., Boulland, M.L., Wechsler, J., Freeman, G.J., Bensussan, A. and Boumsell, L. (1997b) CD101 is expressed by skin dendritic cells. Role in T-lymphocyte activation. *Tissue Antigens*, **50**, 439-448.
- Bain, C., Fatmi, A., Zoulim, F., Zarski, J.P., Trepo, C. and Inchauspe, G. (2001) Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology*, **120**, 512-524.
- Bain, C., Parroche, P., Lavergne, J.P., Duverger, B., Vieux, C., Dubois, V., Komurian-Pradel, F., Trepo, C., Gebuhrer, L., Paranhos-Baccala, G., Penin, F. and Inchauspe, G. (2004) Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol*, **78**, 10460-10469.
- Baldacci, P. and Menard, R. (2004) The elusive malaria sporozoite in the mammalian host. *Mol Microbiol*, **54**, 298-306.
- Bandyopadhyay, S., Zhan, R., Chaudhuri, A., Watabe, M., Pai, S.K., Hirota, S., Hosobe, S., Tsukada, T., Miura, K., Takano, Y., Saito, K., Pauza, M.E., Hayashi, S., Wang, Y., Mohinta, S., Mashimo, T., Iizumi, M., Furuta, E. and Watabe, K. (2006) Interaction of

- KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat Med*, **12**, 933-938.
- Banerjee, S.A., Hadjiargyrou, M. and Patterson, P.H. (1997) An antibody to the tetraspan membrane protein CD9 promotes neurite formation in a partially alpha3beta1 integrin-dependent manner. *J Neurosci*, **17**, 2756-2765.
- Baranova, I.N., Vishnyakova, T.G., Bocharov, A.V., Kurlander, R., Chen, Z., Kimelman, M.L., Remaley, A.T., Csako, G., Thomas, F., Eggerman, T.L. and Patterson, A.P. (2005) Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD36 and LIMP2 analogues) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, **280**, 8031-8040.
- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M.J., Miyamura, T. and Brechot, C. (1997) Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1200-1205.
- Baril, M. and Brakier-Gingras, L. (2005) Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1474-1486.
- Bartenschlager, R. (2006) Hepatitis C virus molecular clones: from cDNA to infectious virus particles in cell culture. *Curr Opin Microbiol*, **9**, 416-422.
- Bartenschlager, R., Frese, M. and Pietschmann, T. (2004) Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res*, **63**, 71-180.
- Bartenschlager, R. and Lohmann, V. (2001) Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res*, **52**, 1-17.
- Barth, H., Cerino, R., Arcuri, M., Hoffmann, M., Schurmann, P., Adah, M.I., Gissler, B., Zhao, X., Ghisetti, V., Lavezzo, B., Blum, H.E., von Weizsacker, F., Vitelli, A., Scarselli, E. and Baumert, T.F. (2005) Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *J Virol*, **79**, 5774-5785.
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T.H., Depla, E., Von Weizsacker, F., Blum, H.E. and Baumert, T.F. (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem*, **278**, 41003-41012.
- Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J.C., Granier, C., Engle, R.E., Blackwelder, W.C., Emerson, S.U., Cosset, F.L. and Purcell, R.H. (2003a) In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14199-14204.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. and Cosset, F.-L. (2003b) Highly infectious hepatitis C pseudo-viruses containing functional E1E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*, **197**, 633-642.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. and Cosset, F.L. (2003c) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*, **197**, 633-642.
- Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J.M., Lavillette, D. and Cosset, F.L. (2005) An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol*, **79**, 8217-8229.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A. and Cosset, F.L. (2003d) Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem*, **278**, 41624-41630.
- Bassett, S.E., Brasky, K.M. and Lanford, R.E. (1998) Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *J Virol*, **72**, 2589-2599.
- Bassett, S.E., Guerra, B., Brasky, K., Miskovsky, E., Houghton, M., Klimpel, G.R. and Lanford, R.E. (2001) Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Hepatology*, **33**, 1479-1487.

- Bassett, S.E., Thomas, D.L., Brasky, K.M. and Lanford, R.E. (1999) Viral persistence, antibody to E1 and E2, and hypervariable region 1 sequence stability in hepatitis C virus-inoculated chimpanzees. *J Virol*, **73**, 1118-1126.
- Bastie, A., Pawlotsky, J.M., Roudot-Thoraval, F. and Dhumeaux, D. (1995) [Hepatitis C virus infection. Epidemiology]. *Pathol Biol (Paris)*, **43**, 674-680.
- Baudoux, B., Castanares-Zapatero, D., Leclercq-Smekens, M., Berna, N. and Poumay, Y. (2000) The tetraspanin CD9 associates with the integrin alpha6beta4 in cultured human epidermal keratinocytes and is involved in cell motility. *Eur J Cell Biol*, **79**, 41-51.
- Baumert, T.F., Ito, S., Wong, D.T. and Liang, T.J. (1998) Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol*, **72**, 3827-3836.
- Baumert, T.F., Wellnitz, S., Aono, S., Satoj, J., Herion, D., Tilman Gerlach, J., Pape, G.R., Lau, J.Y., Hoofnagle, J.H., Blum, H.E. and Liang, T.J. (2000) Antibodies against hepatitis C virus-like particles and viral clearance in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology*, **32**, 610-617.
- Bayes, M., Rabasseda, X. and Prous, J.R. (2004) Gateways to clinical trials. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, **26**, 357-391.
- Beatty, W.L. (2006) Trafficking from CD63-positive late endocytic multivesicular bodies is essential for intracellular development of *Chlamydia trachomatis*. *J Cell Sci*, **119**, 350-359.
- Beaulieu, P.L. and Tsantrizos, Y.S. (2004) Inhibitors of the HCV NS5B polymerase: new hope for the treatment of hepatitis C infections. *Curr Opin Investig Drugs*, **5**, 838-850.
- Behr, S. and Schriever, F. (1995) Engaging CD19 or target of an antiproliferative antibody 1 on human B lymphocytes induces binding of B cells to the interfollicular stroma of human tonsils via integrin alpha 4/beta 1 and fibronectin. *J Exp Med*, **182**, 1191-1199.
- Berdichevski, F. (2001) Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci*, **114**, 4143-4151.
- Berdichevski, F., Bazzoni, G. and Hemler, M.E. (1995) Specific association of CD63 with the VLA-3 and VLA-6 integrins. *J Biol Chem*, **270**, 17784-17790.
- Berdichevski, F., Gilbert, E., Griffiths, M.R., Fitter, S., Ashman, L. and Jenner, S.J. (2001) Analysis of the CD151-alpha3beta1 integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis. *J Biol Chem*, **276**, 41165-41174.
- Berdichevski, F. and Odintsova, E. (1999) Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol*, **146**, 477-492.
- Berdichevski, F. and Odintsova, E. (2007) Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic*, **8**, 89-96.
- Berdichevski, F., Odintsova, E., Sawada, S. and Gilbert, E. (2002) Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem*, **277**, 36991-37000.
- Berdichevski, F., Talias, K.F., Wong, K., Carpenter, C.L. and Hemler, M.E. (1997) A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem*, **272**, 2595-2598.
- Berdichevski, F., Zutter, M.M. and Hemler, M.E. (1996) Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol Biol Cell*, **7**, 193-207.
- Berenguer, M. (2002) Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver Transpl*, **8**, S14-18.
- Bertaux, C. and Dragic, T. (2006) Different domains of CD81 mediate distinct stages of hepatitis C virus pseudoparticle entry. *J Virol*, **80**, 4940-4948.
- Bienstock, R.J. and Barrett, J.C. (2001) KAI1, a prostate metastasis suppressor: prediction of solvated structure and interactions with binding partners; integrins, cadherins, and cell-surface receptor proteins. *Mol Carcinog*, **32**, 139-153.
- Bijlmakers, M.J. and Marsh, M. (2003) The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol*, **13**, 32-42.

- Biswal, B.K., Cherney, M.M., Wang, M., Chan, L., Yannopoulos, C.G., Bilimoria, D., Nicolas, O., Bedard, J. and James, M.N. (2005) Crystal structures of the RNA-dependent RNA polymerase genotype 2a of hepatitis C virus reveal two conformations and suggest mechanisms of inhibition by non-nucleoside inhibitors. *J Biol Chem*, **280**, 18202-18210.
- Bjornsson, E. and Angulo, P. (2007) Hepatitis C and steatosis. *Arch Med Res*, **38**, 621-627.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. and Rouille, Y. (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, **80**, 6964-6972.
- Blanchard, E., Brand, D., Trassard, S., Goudeau, A. and Roingeard, P. (2002) Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J Virol*, **76**, 4073-4079.
- Blight, K.J. (2007) Allelic variation in the hepatitis C virus NS4B protein dramatically influences RNA replication. *J Virol*, **81**, 5724-5736.
- Blight, K.J., Kolykhalov, A.A. and Rice, C.M. (2000) Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*, **290**, 1972-1974.
- Blight, K.J., McKeating, J.A., Marcotrigiano, J. and Rice, C.M. (2003) Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol*, **77**, 3181-3190.
- Blight, K.J., McKeating, J.A. and Rice, C.M. (2002) Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, **76**, 13001-13014.
- Boelaert, J.R., Sperber, K. and Piette, J. (1999) Chloroquine exerts an additive in vitro anti-HIV type 1 effect when associated with didanosine and hydroxyurea. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **15**, 1241-1247.
- Bollinger, C.R., Teichgraber, V. and Gulbins, E. (2005) Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta*, **1746**, 284-294.
- Booth, A.M., Fang, Y., Fallon, J.K., Yang, J.M., Hildreth, J.E. and Gould, S.J. (2006) Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol*, **172**, 923-935.
- Boriskin, Y.S., Leneva, I.A., Pecheur, E.I. and Polyak, S.J. (2008) Arbidol: a broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion. *Curr Med Chem*, **15**, 997-1005.
- Boriskin, Y.S., Pecheur, E.I. and Polyak, S.J. (2006) Arbidol: a broad-spectrum antiviral that inhibits acute and chronic HCV infection. *Virology*, **3**, 56.
- Bost, A.G., Venable, D., Liu, L. and Heinz, B.A. (2003) Cytoskeletal requirements for hepatitis C virus (HCV) RNA synthesis in the HCV replicon cell culture system. *J Virol*, **77**, 4401-4408.
- Botarelli, P., Brunetto, M.R., Minutello, M.A., Calvo, P., Unutmaz, D., Weiner, A.J., Choo, Q.L., Shuster, J.R., Kuo, G., Bonino, F. and et al. (1993) T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology*, **104**, 580-587.
- Boucheix, C., Benoit, P., Frachet, P., Billard, M., Worthington, R.E., Gagnon, J. and Uzan, G. (1991) Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. *J Biol Chem*, **266**, 117-122.
- Boucheix, C., Perrot, J.Y., Mirshahi, M., Giannoni, F., Billard, M., Bernadou, A. and Rosenfeld, C. (1985) A new set of monoclonal antibodies against acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, **9**, 597-604.
- Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2001) Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 1189-1205.
- Boucheix, C., Soria, C., Mirshahi, M., Soria, J., Perrot, J.Y., Fournier, N., Billard, M. and Rosenfeld, C. (1983) Characteristics of platelet aggregation induced by the monoclonal antibody ALB6 (acute lymphoblastic leukemia antigen p 24). Inhibition of aggregation by ALB6Fab. *FEBS Lett*, **161**, 289-295.
- Boulant, S., Becchi, M., Penin, F. and Lavergne, J.P. (2003) Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J Biol Chem*, **278**, 45785-45792.
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R.G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J.P., Penin, F. and McLauchlan, J. (2006) Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem*, **281**, 22236-22247.

- Boulant, S., Targett-Adams, P. and McLauchlan, J. (2007) Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol*, **88**, 2204-2213.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F. and Lavergne, J.P. (2005) Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol*, **79**, 11353-11365.
- Bouloc, A., Bagot, M., Delaire, S., Bensussan, A. and Bousmell, L. (2000a) Triggering CD101 molecule on human cutaneous dendritic cells inhibits T cell proliferation via IL-10 production. *Eur J Immunol*, **30**, 3132-3139.
- Bouloc, A., Boulland, M.L., Geissmann, F., Fraitag, S., Andry, P., Teillac, D., Bensussan, A., Revuz, J., Bousmell, L., Wechsler, J. and Bagot, M. (2000b) CD101 expression by Langerhans cell histiocytosis cells. *Histopathology*, **36**, 229-232.
- Bowen, D.G. and Walker, C.M. (2005) Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*, **436**, 946-952.
- Bradbury, L.E., Goldmacher, V.S. and Tedder, T.F. (1993) The CD19 signal transduction complex of B lymphocytes. Deletion of the CD19 cytoplasmic domain alters signal transduction but not complex formation with TAPA-1 and Leu 13. *J Immunol*, **151**, 2915-2927.
- Bradley, D., McCaustland, K., Krawczynski, K., Spelbring, J., Humphrey, C. and Cook, E.H. (1991) Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J Med Virol*, **34**, 206-208.
- Bradley, D.W., Maynard, J.E., Popper, H., Ebert, J.W., Cook, E.H., Fields, H.A. and Kemler, B.J. (1981) Persistent non-A, non-B hepatitis in experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis*, **143**, 210-218.
- Bradley, D.W., McCaustland, K.A., Cook, E.H., Schable, C.A., Ebert, J.W. and Maynard, J.E. (1985) Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology*, **88**, 773-779.
- Branch, A.D., Stump, D.D., Gutierrez, J.A., Eng, F. and Walewski, J.L. (2005) The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis*, **25**, 105-117.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wolk, B., Hellings, J.A., Blum, H.E., Penin, F. and Moradpour, D. (2002) An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem*, **277**, 8130-8139.
- Braun, R.K., Foerster, M., Grahmann, P.R., Haefner, D., Workalemahu, G. and Kroegel, C. (2003) Phenotypic and molecular characterization of CD103+ CD4+ T cells in bronchoalveolar lavage from patients with interstitial lung diseases. *Cytometry B Clin Cytom*, **54**, 19-27.
- Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M. and Crotta, S. (2008) CD81 is a central regulator of cellular events required for HCV infection of human hepatocytes. *J Virol*.
- Brazzoli, M., Helenius, A., Fong, S.K., Houghton, M., Abrignani, S. and Merola, M. (2005) Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells. *Virology*, **332**, 438-453.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F.A. and De Francesco, R. (2002) Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J Virol*, **76**, 3482-3492.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R.L., Mathieu, M., De Francesco, R. and Rey, F.A. (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13034-13039.
- Brisson, C., Azorsa, D.O., Jennings, L.K., Moog, S., Cazenave, J.P. and Lanza, F. (1997) Co-localization of CD9 and GPIIb-IIIa (alpha IIb beta 3 integrin) on activated platelet pseudopods and alpha-granule membranes. *Histochem J*, **29**, 153-165.

- Bronstein, J.M., Tiwari-Woodruff, S., Buznikov, A.G. and Stevens, D.B. (2000) Involvement of OSP/claudin-11 in oligodendrocyte membrane interactions: role in biology and disease. *J Neurosci Res*, **59**, 706-711.
- Buonocore, L., Blight, K.J., Rice, C.M. and Rose, J.K. (2002) Characterization of vesicular stomatitis virus recombinants that express and incorporate high levels of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol*, **76**, 6865-6872.
- Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Rapp, U. and Cooper, G.M. (1997) Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol*, **17**, 732-741.
- Cai, L., de Beer, M.C., de Beer, F.C. and van der Westhuyzen, D.R. (2005a) Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem*, **280**, 2954-2961.
- Cai, Z., Cai, L., Jiang, J., Chang, K.S., van der Westhuyzen, D.R. and Luo, G. (2007) Human serum amyloid A protein inhibits hepatitis C virus entry into cells. *J Virol*, **81**, 6128-6133.
- Cai, Z., Zhang, C., Chang, K.S., Jiang, J., Ahn, B.C., Wakita, T., Liang, T.J. and Luo, G. (2005b) Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *J Virol*, **79**, 13963-13973.
- Cajot, J.F., Sordat, I., Silvestre, T. and Sordat, B. (1997) Differential display cloning identifies motility-related protein (MRP1/CD9) as highly expressed in primary compared to metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, **57**, 2593-2597.
- Callens, N., Ciczora, Y., Bartosch, B., Vu-Dac, N., Cosset, F.L., Pawlotsky, J.M., Penin, F. and Dubuisson, J. (2005) Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol*, **79**, 15331-15341.
- Cannon, K.S. and Cresswell, P. (2001) Quality control of transmembrane domain assembly in the tetraspanin CD82. *Embo J*, **20**, 2443-2453.
- Cariappa, A., Shoham, T., Liu, H., Levy, S., Boucheix, C. and Pillai, S. (2005) The CD9 tetraspanin is not required for the development of peripheral B cells or for humoral immunity. *J Immunol*, **175**, 2925-2930.
- Carloni, V., Mazzocca, A. and Ravichandran, K.S. (2004) Tetraspanin CD81 is linked to ERK/MAPKinase signaling by Shc in liver tumor cells. *Oncogene*, **23**, 1566-1574.
- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F. and Dubuisson, J. (2002) Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol*, **76**, 3720-3730.
- Castet, V., Fournier, C., Soulier, A., Brillet, R., Coste, J., Larrey, D., Dhumeaux, D., Maurel, P. and Pawlotsky, J.M. (2002) Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virol*, **76**, 8189-8199.
- Catanese, M.T., Graziani, R., von Hahn, T., Moreau, M., Huby, T., Paonessa, G., Santini, C., Luzzago, A., Rice, C.M., Cortese, R., Vitelli, A. and Nicosia, A. (2007) High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *J Virol*, **81**, 8063-8071.
- Chang, K.S., Jiang, J., Cai, Z. and Luo, G. (2007) Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol*, **81**, 13783-13793.
- Chapel, C., Garcia, C., Bartosch, B., Roingeard, P., Zitzmann, N., Cosset, F.L., Dubuisson, J., Dwek, R.A., Trepo, C., Zoulim, F. and Durantel, D. (2007) Reduction of the infectivity of hepatitis C virus pseudoparticles by incorporation of misfolded glycoproteins induced by glucosidase inhibitors. *J Gen Virol*, **88**, 1133-1143.
- Chapel, C., Garcia, C., Roingeard, P., Zitzmann, N., Dubuisson, J., Dwek, R.A., Trepo, C., Zoulim, F. and Durantel, D. (2006) Antiviral effect of alpha-glucosidase inhibitors on viral morphogenesis and binding properties of hepatitis C virus-like particles. *J Gen Virol*, **87**, 861-871.
- Charrin, S., Le Naour, F., Labas, V., Billard, M., Le Caer, J.P., Emile, J.F., Petit, M.A., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2003a) EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J*, **373**, 409-421.

- Charrin, S., Le Naour, F., Oualid, M., Billard, M., Faure, G., Hanash, S.M., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2001) The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem*, **276**, 14329-14337.
- Charrin, S., Manie, S., Billard, M., Ashman, L., Gerlier, D., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2003b) Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 107-112.
- Charrin, S., Manie, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2002) Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett*, **516**, 139-144.
- Charrin, S., Manie, S., Thiele, C., Billard, M., Gerlier, D., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2003c) A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *Eur J Immunol*, **33**, 2479-2489.
- Chen, S.H. and Tan, S.L. (2005) Discovery of small-molecule inhibitors of HCV NS3-4A protease as potential therapeutic agents against HCV infection. *Curr Med Chem*, **12**, 2317-2342.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J. and Marks, R.M. (1997) Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*, **3**, 866-871.
- Chertova, E., Chertov, O., Coren, L.V., Roser, J.D., Trubey, C.M., Bess, J.W., Jr., Sowder, R.C., 2nd, Barsov, E., Hood, B.L., Fisher, R.J., Nagashima, K., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Lifson, J.D. and Ott, D.E. (2006) Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol*, **80**, 9039-9052.
- Cherukuri, A., Carter, R.H., Brooks, S., Bornmann, W., Finn, R., Dowd, C.S. and Pierce, S.K. (2004a) B cell signaling is regulated by induced palmitoylation of CD81. *J Biol Chem*, **279**, 31973-31982.
- Cherukuri, A., Shoham, T., Sohn, H.W., Levy, S., Brooks, S., Carter, R. and Pierce, S.K. (2004b) The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *J Immunol*, **172**, 370-380.
- Choi, S.H., Kim, S.Y., Park, K.J., Kim, Y.J. and Hwang, S.B. (2004) Hepatitis C virus core protein is efficiently released into the culture medium in insect cells. *J Biochem Mol Biol*, **37**, 735-740.
- Choi, S.H., Park, K.J., Ahn, B.Y., Jung, G., Lai, M.M. and Hwang, S.B. (2006) Hepatitis C virus nonstructural 5B protein regulates tumor necrosis factor alpha signaling through effects on cellular I κ B kinase. *Mol Cell Biol*, **26**, 3048-3059.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Van Nest, G., Han, J., Berger, K., Thudium, K., Kuo, C. and et al. (1994) Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1294-1298.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. and Houghton, M. (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, **244**, 359-362.
- Choo, S.H., So, H.S., Cho, J.M. and Ryu, W.S. (1995) Association of hepatitis C virus particles with immunoglobulin: a mechanism for persistent infection. *J Gen Virol*, **76** (Pt 9), 2337-2341.
- Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C. and Dubuisson, J. (1998) Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol*, **72**, 3851-3858.
- Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C. and Rothblat, G.H. (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res*, **38**, 2264-2272.
- Ciccaglione, A.R., Costantino, A., Marcantonio, C., Equestre, M., Geraci, A. and Rapicetta, M. (2001) Mutagenesis of hepatitis C virus E1 protein affects its membrane-permeabilizing activity. *J Gen Virol*, **82**, 2243-2250.
- Ciczora, Y., Callens, N., Montpellier, C., Bartosch, B., Cosset, F.L., Op de Beeck, A. and Dubuisson, J. (2005) Contribution of the charged residues of hepatitis C virus

- glycoprotein E2 transmembrane domain to the functions of the E1E2 heterodimer. *J Gen Virol*, **86**, 2793-2798.
- Ciczora, Y., Callens, N., Penin, F., Pecheur, E.I. and Dubuisson, J. (2007) Transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins: residues involved in E1E2 heterodimerization and involvement of these domains in virus entry. *J Virol*, **81**, 2372-2381.
- Claas, C., Seiter, S., Claas, A., Savelyeva, L., Schwab, M. and Zoller, M. (1998) Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy. *J Cell Biol*, **141**, 267-280.
- Claas, C., Stipp, C.S. and Hemler, M.E. (2001) Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem*, **276**, 7974-7984.
- Clark, K.L., Oelke, A., Johnson, M.E., Eilert, K.D., Simpson, P.C. and Todd, S.C. (2004) CD81 associates with 14-3-3 in a redox-regulated palmitoylation-dependent manner. *J Biol Chem*, **279**, 19401-19406.
- Clark, K.L., Zeng, Z., Langford, A.L., Bowen, S.M. and Todd, S.C. (2001) PGRL is a major CD81-associated protein on lymphocytes and distinguishes a new family of cell surface proteins. *J Immunol*, **167**, 5115-5121.
- Clay, D., Rubinstein, E., Mishal, Z., Anjo, A., Prenant, M., Jasmin, C., Boucheix, C. and Le Bousse-Kerdiles, M.C. (2001) CD9 and megakaryocyte differentiation. *Blood*, **97**, 1982-1989.
- Cocquerel, L., Duvet, S., Meunier, J.C., Pillez, A., Cacan, R., Wychowski, C. and Dubuisson, J. (1999) The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *J Virol*, **73**, 2641-2649.
- Cocquerel, L., Kuo, C.C., Dubuisson, J. and Levy, S. (2003a) CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers. *J Virol*, **77**, 10677-10683.
- Cocquerel, L., Meunier, J.C., Pillez, A., Wychowski, C. and Dubuisson, J. (1998) A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol*, **72**, 2183-2191.
- Cocquerel, L., Op de Beeck, A., Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F. and Dubuisson, J. (2002) Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Embo J*, **21**, 2893-2902.
- Cocquerel, L., Quinn, E.R., Flint, M., Hadlock, K.G., Fong, S.K. and Levy, S. (2003b) Recognition of native hepatitis C virus E1E2 heterodimers by a human monoclonal antibody. *J Virol*, **77**, 1604-1609.
- Cocquerel, L., Voisset, C. and Dubuisson, J. (2006) Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol*, **87**, 1075-1084.
- Cocquerel, L., Wychowski, C., Minner, F., Penin, F. and Dubuisson, J. (2000) Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J Virol*, **74**, 3623-3633.
- Coffey, G., Kuo, C.-C. & Levy, S. (2006) Co-ligation of CD81 and the B-cell receptor by Hepatitis C Virus envelope protein E2 enhances B-cell signaling. In Conferences, F.S.R. (ed.), *Membrane Organization by tetraspanins and small multi-transmembrane proteins*, Tucson, AZ, USA.
- Connelly, M.A. and Williams, D.L. (2003) SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells. *Trends Endocrinol Metab*, **14**, 467-472.
- Cooper, S., Erickson, A.L., Adams, E.J., Kansopon, J., Weiner, A.J., Chien, D.Y., Houghton, M., Parham, P. and Walker, C.M. (1999) Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*, **10**, 439-449.
- Cormier, E.G., Durso, R.J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W.C., Gardner, J.P. and Dragic, T. (2004a) L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14067-14072.

- Cormier, E.G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R.J., Gardner, J.P. and Dragic, T. (2004b) CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7270-7274.
- Cox, A.L., Mosbrugger, T., Mao, Q., Liu, Z., Wang, X.H., Yang, H.C., Sidney, J., Sette, A., Pardoll, D., Thomas, D.L. and Ray, S.C. (2005) Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med*, **201**, 1741-1752.
- Coyne, C.B. and Bergelson, J.M. (2006) Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*, **124**, 119-131.
- Cramp, M.E., Rossol, S., Chokshi, S., Carucci, P., Williams, R. and Naoumov, N.V. (2000) Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, **118**, 346-355.
- Cribier, B., Schmitt, C., Bingen, A., Kirn, A. and Keller, F. (1995) In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J Gen Virol*, **76 (Pt 10)**, 2485-2491.
- Cribier, B., Schmitt, C., Kirn, A. and Stoll-Keller, F. (1998) Inhibition of hepatitis C virus adsorption to peripheral blood mononuclear cells by dextran sulfate. *Arch Virol*, **143**, 375-379.
- Crotta, S., Ronconi, V., Ulivieri, C., Baldari, C.T., Valiante, N.M., Abrignani, S. and Wack, A. (2006) Cytoskeleton rearrangement induced by tetraspanin engagement modulates the activation of T and NK cells. *Eur J Immunol*, **36**, 919-929.
- Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R.M., Bonino, F., Abrignani, S. and Valiante, N.M. (2002) Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med*, **195**, 35-41.
- Crowther, D.C., Belorgey, D., Miranda, E., Kinghorn, K.J., Sharp, L.K. and Lomas, D.A. (2004) Practical genetics: alpha-1-antitrypsin deficiency and the serpinopathies. *Eur J Hum Genet*, **12**, 167-172.
- Day, C.L., Lauer, G.M., Robbins, G.K., McGovern, B., Wurcel, A.G., Gandhi, R.T., Chung, R.T. and Walker, B.D. (2002) Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol*, **76**, 12584-12595.
- Day, C.L., Seth, N.P., Lucas, M., Appel, H., Gauthier, L., Lauer, G.M., Robbins, G.K., Szczepiorkowski, Z.M., Casson, D.R., Chung, R.T., Bell, S., Harcourt, G., Walker, B.D., Klenerman, P. and Wucherpfennig, K.W. (2003) Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *J Clin Invest*, **112**, 831-842.
- De Francesco, R. and Migliaccio, G. (2005) Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature*, **436**, 953-960.
- de Parseval, A., Lerner, D.L., Borrow, P., Willett, B.J. and Elder, J.H. (1997) Blocking of feline immunodeficiency virus infection by a monoclonal antibody to CD9 is via inhibition of virus release rather than interference with receptor binding. *J Virol*, **71**, 5742-5749.
- Deforges, S., Evlashev, A., Perret, M., Sodoyer, M., Pouzol, S., Scoazec, J.Y., Bonnaud, B., Diaz, O., Paranhos-Baccala, G., Lotteau, V. and Andre, P. (2004) Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J Gen Virol*, **85**, 2515-2523.
- Delaguillaumie, A., Harriague, J., Kohanna, S., Bismuth, G., Rubinstein, E., Seigneuret, M. and Conjeaud, H. (2004) Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation. *J Cell Sci*, **117**, 5269-5282.
- Delaguillaumie, A., Lagaudriere-Gesbert, C., Popoff, M.R. and Conjeaud, H. (2002) Rho GTPases link cytoskeletal rearrangements and activation processes induced via the tetraspanin CD82 in T lymphocytes. *J Cell Sci*, **115**, 433-443.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y.S., Rice, C.M. and Dubuisson, J. (1997) Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol*, **71**, 697-704.

- Delgrange, D., Pillez, A., Castelain, S., Cocquerel, L., Rouille, Y., Dubuisson, J., Wakita, T., Duverlie, G. and Wychowski, C. (2007) Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol*, **88**, 2495-2503.
- Dempsey, P.W. and Fearon, D.T. (1996) Complement: instructing the acquired immune system through the CD21/CD19 complex. *Res Immunol*, **147**, 71-75; discussion 119-120.
- Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E. and Marsh, M. (2007) In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol*, **177**, 329-341.
- Deng, J., Dekruyff, R.H., Freeman, G.J., Umetsu, D.T. and Levy, S. (2002) Critical role of CD81 in cognate T-B cell interactions leading to Th2 responses. *Int Immunol*, **14**, 513-523.
- Deng, J., Yeung, V.P., Tsitoura, D., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T. and Levy, S. (2000) Allergen-induced airway hyperreactivity is diminished in CD81-deficient mice. *J Immunol*, **165**, 5054-5061.
- Deng, L., Nagano-Fujii, M., Tanaka, M., Nomura-Takigawa, Y., Ikeda, M., Kato, N., Sada, K. and Hotta, H. (2006) NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J Gen Virol*, **87**, 1703-1713.
- Di Marco, S., Volpari, C., Tomei, L., Altamura, S., Harper, S., Narjes, F., Koch, U., Rowley, M., De Francesco, R., Migliaccio, G. and Carfi, A. (2005) Interdomain communication in hepatitis C virus polymerase abolished by small molecule inhibitors bound to a novel allosteric site. *J Biol Chem*, **280**, 29765-29770.
- Dijkstra, S., Geisert, E.J., Gispen, W.H., Bar, P.R. and Joosten, E.A. (2000) Up-regulation of CD81 (target of the antiproliferative antibody; TAPA) by reactive microglia and astrocytes after spinal cord injury in the rat. *J Comp Neurol*, **428**, 266-277.
- Disson, O., Haouzi, D., Desagher, S., Loesch, K., Hahne, M., Kremer, E.J., Jacquet, C., Lemon, S.M., Hibner, U. and Lerat, H. (2004) Impaired clearance of virus-infected hepatocytes in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology*, **126**, 859-872.
- Doh-ura, K., Mekada, E., Ogomori, K. and Iwaki, T. (2000) Enhanced CD9 expression in the mouse and human brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. *J Neuropathol Exp Neurol*, **59**, 774-785.
- Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Grande-Perez, A., Garcia-Arriaza, J. and Arias, A. (2006) Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, **299**, 51-82.
- Dong, J.T., Lamb, P.W., Rinker-Schaeffer, C.W., Vukanovic, J., Ichikawa, T., Isaacs, J.T. and Barrett, J.C. (1995) KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*, **268**, 884-886.
- Dreux, M., Boson, B., Ricard-Blum, S., Molle, J., Lavillette, D., Bartosch, B., Pecheur, E.I. and Cosset, F.L. (2007) The exchangeable apolipoprotein ApoC-I promotes membrane fusion of hepatitis C virus. *J Biol Chem*, **282**, 32357-32369.
- Dreux, M., Pietschmann, T., Granier, C., Voisset, C., Ricard-Blum, S., Mangeot, P.E., Keck, Z., Fong, S., Vu-Dac, N., Dubuisson, J., Bartenschlager, R., Lavillette, D. and Cosset, F.L. (2006) High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem*, **281**, 18285-18295.
- Drucker, L., Tohami, T., Tartakover-Matalon, S., Zismanov, V., Shapiro, H., Radnay, J. and Lishner, M. (2006) Promoter hypermethylation of tetraspanin members contributes to their silencing in myeloma cell lines. *Carcinogenesis*, **27**, 197-204.
- Drummer, H.E., Boo, I., Maerz, A.L. and Pountourios, P. (2006) A conserved Gly436-Trp-Leu-Ala-Gly-Leu-Phe-Tyr motif in hepatitis C virus glycoprotein E2 is a determinant of CD81 binding and viral entry. *J Virol*, **80**, 7844-7853.

- Drummer, H.E., Boo, I. and Pountourios, P. (2007) Mutagenesis of a conserved fusion peptide-like motif and membrane-proximal heptad-repeat region of hepatitis C virus glycoprotein E1. *J Gen Virol*, **88**, 1144-1148.
- Drummer, H.E., Maerz, A. and Pountourios, P. (2003) Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett*, **546**, 385-390.
- Drummer, H.E., Wilson, K.A. and Pountourios, P. (2002) Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *J Virol*, **76**, 11143-11147.
- Drummer, H.E., Wilson, K.A. and Pountourios, P. (2005) Determinants of CD81 dimerization and interaction with hepatitis C virus glycoprotein E2. *Biochem Biophys Res Commun*, **328**, 251-257.
- Dubois, F., Desenclos, J.C., Mariotte, N. and Goudeau, A. (1997) Hepatitis C in a French population-based survey, 1994: seroprevalence, frequency of viremia, genotype distribution, and risk factors. The Collaborative Study Group. *Hepatology*, **25**, 1490-1496.
- Dubuisson, J., Duvet, S., Meunier, J.C., Op De Beeck, A., Cacan, R., Wychowski, C. and Cocquerel, L. (2000) Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 is dependent on the presence of a downstream sequence on the viral polyprotein. *J Biol Chem*, **275**, 30605-30609.
- Dubuisson, J., Helle, F. and Cocquerel, L. (2008) Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol*, **10**, 821-827.
- Dubuisson, J., Hsu, H.H., Cheung, R.C., Greenberg, H.B., Russell, D.G. and Rice, C.M. (1994) Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol*, **68**, 6147-6160.
- Dubuisson, J., Penin, F. and Moradpour, D. (2002) Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol*, **12**, 517-523.
- Duffield, A., Kamsteeg, E.J., Brown, A.N., Pagel, P. and Caplan, M.J. (2003) The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15560-15565.
- Durantel, D., Branza-Nichita, N., Carrouee-Durantel, S., Butters, T.D., Dwek, R.A. and Zitzmann, N. (2001) Study of the mechanism of antiviral action of iminosugar derivatives against bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, **75**, 8987-8998.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D. and Bienz, K. (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*, **76**, 5974-5984.
- Einav, S., Elazar, M., Danieli, T. and Glenn, J.S. (2004) A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol*, **78**, 11288-11295.
- Ellerman, D.A., Ha, C., Primakoff, P., Myles, D.G. and Dveksler, G.S. (2003) Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. *Mol Biol Cell*, **14**, 5098-5103.
- Engel, P. and Tedder, T.F. (1994) New CD from the B cell section of the Fifth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. *Leuk Lymphoma*, **13 Suppl 1**, 61-64.
- Engelman, D.M., Chen, Y., Chin, C.N., Curran, A.R., Dixon, A.M., Dupuy, A.D., Lee, A.S., Lehnert, U., Matthews, E.E., Reshetnyak, Y.K., Senes, A. and Popot, J.L. (2003) Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett*, **555**, 122-125.
- Erickson, A.L., Houghton, M., Choo, Q.L., Weiner, A.J., Ralston, R., Muchmore, E. and Walker, C.M. (1993) Hepatitis C virus-specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. *J Immunol*, **151**, 4189-4199.
- Erickson, A.L., Kimura, Y., Igarashi, S., Eichelberger, J., Houghton, M., Sidney, J., McKinney, D., Sette, A., Hughes, A.L. and Walker, C.M. (2001) The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, **15**, 883-895.

- Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O. and Geuze, H.J. (1998) Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem*, **273**, 20121-20127.
- Evans, J.D. and Seeger, C. (2006) Cardif: a protein central to innate immunity is inactivated by the HCV NS3 serine protease. *Hepatology*, **43**, 615-617.
- Evans, M.J., Rice, C.M. and Goff, S.P. (2004) Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 13038-13043.
- 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.
- Falkowska, E., Kajumo, F., Garcia, E., Reinus, J. and Dragic, T. (2007) Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *J Virol*, **81**, 8072-8079.
- Farci, P., Alter, H.J., Govindarajan, S., Wong, D.C., Engle, R., Lesniewski, R.R., Mushahwar, I.K., Desai, S.M., Miller, R.H., Ogata, N. and et al. (1992) Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science*, **258**, 135-140.
- Farci, P., Alter, H.J., Wong, D.C., Miller, R.H., Govindarajan, S., Engle, R., Shapiro, M. and Purcell, R.H. (1994) Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7792-7796.
- Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzer, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H.J. and Purcell, R.H. (1996) Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15394-15399.
- Farquhar, M.J., Harris, H.J., Diskar, M., Jones, S., Mee, C.J., Nielsen, S.U., Brimacombe, C.L., Molina, S., Toms, G.L., Maurel, P., Howl, J., Herberg, F.W., van Ijzendoorn, S.C., Balfe, P. and McKeating, J.A. (2008) Protein Kinase A dependent step(s) in Hepatitis C virus entry and infectivity. *J Virol*.
- Feigelson, S.W., Grabovsky, V., Shamri, R., Levy, S. and Alon, R. (2003) The CD81 tetraspanin facilitates instantaneous leukocyte VLA-4 adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) under shear flow. *J Biol Chem*, **278**, 51203-51212.
- Feinstone, S.M., Alter, H.J., Dienes, H.P., Shimizu, Y., Popper, H., Blackmore, D., Sly, D., London, W.T. and Purcell, R.H. (1981) Non-A, non-B hepatitis in chimpanzees and marmosets. *J Infect Dis*, **144**, 588-598.
- Feinstone, S.M., Mihalik, K.B., Kamimura, T., Alter, H.J., London, W.T. and Purcell, R.H. (1983) Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun*, **41**, 816-821.
- Fernandez, I., Zeiser, R., Karsunky, H., Kambham, N., Beilhack, A., Soderstrom, K., Negrin, R.S. and Engleman, E. (2007) CD101 surface expression discriminates potency among murine FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol*, **179**, 2808-2814.
- Ferron, F., Bussetta, C., Dutartre, H. and Canard, B. (2005) The modeled structure of the RNA dependent RNA polymerase of GBV-C virus suggests a role for motif E in Flaviviridae RNA polymerases. *BMC Bioinformatics*, **6**, 255.
- Fiorucci, M., Boulant, S., Fournillier, A., Abraham, J.D., Lavergne, J.P., Paranhos-Baccala, G., Inchauspe, G. and Bain, C. (2007) Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *J Gen Virol*, **88**, 1149-1162.
- Fipaldini, C., Bellei, B. and La Monica, N. (1999) Expression of hepatitis C virus cDNA in human hepatoma cell line mediated by a hybrid baculovirus-HCV vector. *Virology*, **255**, 302-311.
- Fischer, R., Baumert, T. and Blum, H.E. (2007) Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol*, **13**, 4865-4872.

- Fitter, S., Tetaz, T.J., Berndt, M.C. and Ashman, L.K. (1995) Molecular cloning of cDNA encoding a novel platelet-endothelial cell tetra-span antigen, PETA-3. *Blood*, **86**, 1348-1355.
- Flint, M., Dubuisson, J., Maidens, C., Harrop, R., Guile, G.R., Borrow, P. and McKeating, J.A. (2000) Functional characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol*, **74**, 702-709.
- Flint, M., Logvinoff, C., Rice, C.M. and McKeating, J.A. (2004) Characterization of infectious retroviral pseudotype particles bearing hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol*, **78**, 6875-6882.
- Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L.D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S. and McKeating, J.A. (1999a) Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol*, **73**, 6235-6244.
- Flint, M., Thomas, J.M., Maidens, C.M., Shotton, C., Levy, S., Barclay, W.S. and McKeating, J.A. (1999b) Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol*, **73**, 6782-6790.
- Flint, M., von Hahn, T., Zhang, J., Farquhar, M., Jones, C.T., Balfe, P., Rice, C.M. and McKeating, J.A. (2006) Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J Virol*, **80**, 11331-11342.
- Forestier, N., Reesink, H.W., Weegink, C.J., McNair, L., Kieffer, T.L., Chu, H.M., Purdy, S., Jansen, P.L. and Zeuzem, S. (2007) Antiviral activity of telaprevir (VX-950) and peginterferon alfa-2a in patients with hepatitis C. *Hepatology*, **46**, 640-648.
- Forns, X., Thimme, R., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Chisari, F.V. and Bukh, J. (2000) Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13318-13323.
- Forton, D.M., Karayiannis, P., Mahmud, N., Taylor-Robinson, S.D. and Thomas, H.C. (2004) Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol*, **78**, 5170-5183.
- Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., Domergue, J. and Maurel, P. (1998) In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol*, **79** (Pt 10), 2367-2374.
- Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Ikeda, M., Lemon, S.M. and Gale, M., Jr. (2003) Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, **300**, 1145-1148.
- Franck, N., Le Seyec, J., Guguen-Guillouzo, C. and Erdtmann, L. (2005) Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *J Virol*, **79**, 2700-2708.
- Frasca, L., Del Porto, P., Tuosto, L., Marinari, B., Scotta, C., Carbonari, M., Nicosia, A. and Piccolella, E. (1999) Hypervariable region 1 variants act as TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4+ T cells. *J Immunol*, **163**, 650-658.
- Frevert, U. (2004) Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol*, **20**, 417-424.
- Friebe, P. and Bartenschlager, R. (2002) Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol*, **76**, 5326-5338.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N. and Bartenschlager, R. (2001) Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol*, **75**, 12047-12057.
- Fried, M.W. (2002) Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology*, **36**, S237-244.
- Fritzsche, B., Schwer, B., Kartenbeck, J., Pedal, A., Horejsi, V. and Ott, M. (2002) Release and intercellular transfer of cell surface CD81 via microparticles. *J Immunol*, **169**, 5531-5537.

- Fukudome, K., Furuse, M., Fukuhara, N., Orita, S., Imai, T., Takagi, S., Nagira, M., Hinuma, Y. and Yoshie, O. (1992) Strong induction of ICAM-1 in human T cells transformed by human T-cell-leukemia virus type 1 and depression of ICAM-1 or LFA-1 in adult T-cell-leukemia-derived cell lines. *Int J Cancer*, **52**, 418-427.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, 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. *J Cell Biol*, **141**, 1539-1550.
- Gale, M., Jr. and Foy, E.M. (2005) Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*, **436**, 939-945.
- Gale, M.J., Jr., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R. and Katze, M.G. (1997) Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*, **230**, 217-227.
- Galossi, A., Guarisco, R., Bellis, L. and Puoti, C. (2007) Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *J Gastrointest Liver Dis*, **16**, 65-73.
- Garcia-Espana, A., Chung, P.J., Sarkar, I.N., Stiner, E., Sun, T.T. and Desalle, R. (2008) Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. *Genomics*, **91**, 326-334.
- Garcia-Frigola, C., Burgaya, F., Calbet, M., de Lecea, L. and Soriano, E. (2000) Mouse Tspan-5, a member of the tetraspanin superfamily, is highly expressed in brain cortical structures. *Neuroreport*, **11**, 3181-3185.
- Garcia, E., Nikolic, D.S. and Piguët, V. (2008) HIV-1 replication in dendritic cells occurs through a tetraspanin-containing compartment enriched in AP-3. *Traffic*, **9**, 200-214.
- Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J.F., Blot, G., Leuba, F., Escola, J.M., Demarex, N., Marsh, M. and Piguët, V. (2005) HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic*, **6**, 488-501.
- Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T. and Olson, W.C. (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4498-4503.
- Garry, R.F. and Dash, S. (2003) Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology*, **307**, 255-265.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W. and Chisari, F.V. (2008) Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol*, **82**, 2120-2129.
- Gastaminza, P., Kapadia, S.B. and Chisari, F.V. (2006) Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol*, **80**, 11074-11081.
- Geary, S.M., Cambareri, A.C., Sincock, P.M., Fitter, S. and Ashman, L.K. (2001) Differential tissue expression of epitopes of the tetraspanin CD151 recognised by monoclonal antibodies. *Tissue Antigens*, **58**, 141-153.
- Geisert, E.E., Jr., Williams, R.W., Geisert, G.R., Fan, L., Asbury, A.M., Maecker, H.T., Deng, J. and Levy, S. (2002) Increased brain size and glial cell number in CD81-null mice. *J Comp Neurol*, **453**, 22-32.
- Gerlach, J.T., Diepolder, H.M., Jung, M.C., Gruener, N.H., Schraut, W.W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C.A., Santantonio, T. and Pape, G.R. (1999) Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, **117**, 933-941.
- Gerlach, J.T., Ulsenheimer, A., Gruner, N.H., Jung, M.C., Schraut, W., Schirren, C.A., Heeg, M., Scholz, S., Witter, K., Zahn, R., Vogler, A., Zachoval, R., Pape, G.R. and Diepolder, H.M. (2005) Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J Virol*, **79**, 12425-12433.

- Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W., Zarski, J.P. and Drouet, E. (2002a) Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol*, **68**, 206-215.
- Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W., Zarski, J.P. and Drouet, E. (2002b) Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*, **292**, 162-168.
- Gesierich, S., Berezovskiy, I., Ryschich, E. and Zoller, M. (2006) Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. *Cancer Res*, **66**, 7083-7094.
- Goenaga, A.L., Zhou, Y., Legay, C., Bougherara, H., Huang, L., Liu, B., Drummond, D.C., Kirpotin, D.B., Auclair, C., Marks, J.D. and Poul, M.A. (2007) Identification and characterization of tumor antigens by using antibody phage display and intrabody strategies. *Mol Immunol*, **44**, 3777-3788.
- Goffard, A., Callens, N., Bartosch, B., Wychowski, C., Cosset, F.L., Montpellier, C. and Dubuisson, J. (2005) Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol*, **79**, 8400-8409.
- Goffard, A. and Dubuisson, J. (2003) Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie*, **85**, 295-301.
- Goldberg, A.F., Moritz, O.L. and Molday, R.S. (1995) Heterologous expression of photoreceptor peripherin/rds and Rom-1 in COS-1 cells: assembly, interactions, and localization of multisubunit complexes. *Biochemistry*, **34**, 14213-14219.
- Golden-Mason, L. and Rosen, H.R. (2006) Natural killer cells: primary target for hepatitis C virus immune evasion strategies? *Liver Transpl*, **12**, 363-372.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. and Jaramillo, B.E. (2003) Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, **81**, 1-44.
- Gordon-Alonso, M., Yanez-Mo, M., Barreiro, O., Alvarez, S., Munoz-Fernandez, M.A., Valenzuela-Fernandez, A. and Sanchez-Madrid, F. (2006) Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *J Immunol*, **177**, 5129-5137.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Bienz, K. and Moradpour, D. (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol*, **77**, 5487-5492.
- Gouttefangeas, C., Jacquot, S., Meffre, E., Schmid, M., Boumsell, L. and Bensussan, A. (1994) Differential proliferative responses in subsets of human CD28+ cells delineated by BB27 mAb. *Int Immunol*, **6**, 423-430.
- Grabowska, A.M., Lechner, F., Klenerman, P., Tighe, P.J., Ryder, S., Ball, J.K., Thomson, B.J., Irving, W.L. and Robins, R.A. (2001) Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection. *Eur J Immunol*, **31**, 2388-2394.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S.M. and Rice, C.M. (1993) Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol*, **67**, 1385-1395.
- Gravelle, C.R., Bradley, D.W., Cook, E.H. and Maynard, J.E. (1982) Temporal patterns of ultrastructural alterations in hepatocytes of chimpanzees with experimental non-A, non-B hepatitis. *J Infect Dis*, **145**, 854-858.
- Greenwood, B.M., Bojang, K., Whitty, C.J. and Targett, G.A. (2005) Malaria. *Lancet*, **365**, 1487-1498.
- Gretton, S.N., Taylor, A.I. and McLauchlan, J. (2005) Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol*, **86**, 1415-1421.
- Griffin, S., Clarke, D., McCormick, C., Rowlands, D. and Harris, M. (2005) Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes. *J Virol*, **79**, 15525-15536.
- Griffin, S.D., Harvey, R., Clarke, D.S., Barclay, W.S., Harris, M. and Rowlands, D.J. (2004) A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol*, **85**, 451-461.

- Grove, J., Huby, T., Stamatakis, Z., Vanwolleghem, T., Meuleman, P., Farquhar, M., Schwarz, A., Moreau, M., Owen, J.S., Leroux-Roels, G., Balfe, P. and McKeating, J.A. (2007) Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity. *J Virol*, **81**, 3162-3169.
- Gruener, N.H., Lechner, F., Jung, M.C., Diepolder, H., Gerlach, T., Lauer, G., Walker, B., Sullivan, J., Phillips, R., Pape, G.R. and Klennerman, P. (2001) Sustained dysfunction of antiviral CD8⁺ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol*, **75**, 5550-5558.
- Gruener, N.H., Gerlach, T.J., Jung, M.C., Diepolder, H.M., Schirren, C.A., Schraut, W.W., Hoffmann, R., Zachoval, R., Santantonio, T., Cucchiarini, M., Cerny, A. and Pape, G.R. (2000) Association of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis*, **181**, 1528-1536.
- Guadalupe Ercilla, M. and Vinas, O. (2000) Extrahepatic symptoms of hepatitis C virus infection: relation to autoimmune response. *Nephrol Dial Transplant*, **15 Suppl 8**, 24-27.
- Gumbiner, B.M. (1993) Breaking through the tight junction barrier. *J Cell Biol*, **123**, 1631-1633.
- Gutierrez-Lopez, M.D., Ovalle, S., Yanez-Mo, M., Sanchez-Sanchez, N., Rubinstein, E., Olmo, N., Lizarbe, M.A., Sanchez-Madrid, F. and Cabanas, C. (2003) A functionally relevant conformational epitope on the CD9 tetraspanin depends on the association with activated beta1 integrin. *J Biol Chem*, **278**, 208-218.
- Hadlock, K.G., Lanford, R.E., Perkins, S., Rowe, J., Yang, Q., Levy, S., Pileri, P., Abrignani, S. and Fong, S.K. (2000) Human monoclonal antibodies that inhibit binding of hepatitis C virus E2 protein to CD81 and recognize conserved conformational epitopes. *J Virol*, **74**, 10407-10416.
- Hahn, Y.S. (2003) Subversion of immune responses by hepatitis C virus: immunomodulatory strategies beyond evasion? *Curr Opin Immunol*, **15**, 443-449.
- Hamamoto, K., Ohga, S., Nomura, S. and Yasunaga, K. (1994) Cellular distribution of CD63 antigen in platelets and in three megakaryocytic cell lines. *Histochem J*, **26**, 367-375.
- Harris, H.J., Farquhar, M.J., Mee, C.J., Davis, C., Reynolds, G.M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S.G., Han, J.H., Balfe, P. and McKeating, J.A. (2008) CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol*, **82**, 5007-5020.
- Hashida, H., Takabayashi, A., Tokuhara, T., Hattori, N., Taki, T., Hasegawa, H., Satoh, S., Kobayashi, N., Yamaoka, Y. and Miyake, M. (2003) Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *Br J Cancer*, **89**, 158-167.
- Hasuwa, H., Shishido, Y., Yamazaki, A., Kobayashi, T., Yu, X. and Mekada, E. (2001) CD9 amino acids critical for upregulation of diphtheria toxin binding. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 782-790.
- Hatch, F.T. (1968) Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv Lipid Res*, **6**, 1-68.
- Hatsuzawa, K., Hosaka, M., Nakagawa, T., Nagase, M., Shoda, A., Murakami, K. and Nakayama, K. (1990) Structure and expression of mouse furin, a yeast Kex2-related protease. Lack of processing of coexpressed prorenin in GH4C1 cells. *J Biol Chem*, **265**, 22075-22078.
- Hayashi, T., Rumbaugh, G. and Huganir, R.L. (2005) Differential regulation of AMPA receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites. *Neuron*, **47**, 709-723.
- He, L.F., Alling, D., Popkin, T., Shapiro, M., Alter, H.J. and Purcell, R.H. (1987) Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis*, **156**, 636-640.
- He, X.S., Rehmann, B., Lopez-Labrador, F.X., Boisvert, J., Cheung, R., Mumm, J., Wedemeyer, H., Berenguer, M., Wright, T.L., Davis, M.M. and Greenberg, H.B. (1999) Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5692-5697.

- Heile, J.M., Fong, Y.L., Rosa, D., Berger, K., Saletti, G., Campagnoli, S., Bensi, G., Capo, S., Coates, S., Crawford, K., Dong, C., Winger, M., Baker, G., Cousens, L., Chien, D., Ng, P., Archangel, P., Grandi, G., Houghton, M. and Abrignani, S. (2000) Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA-based vaccine candidates. *J Virol*, **74**, 6885-6892.
- Heim, M.H., Moradpour, D. and Blum, H.E. (1999) Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. *J Virol*, **73**, 8469-8475.
- Heiskala, M., Peterson, P.A. and Yang, Y. (2001) The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic*, **2**, 93-98.
- Helle, F., Goffard, A., Morel, V., Duverlie, G., McKeating, J., Keck, Z.Y., Fong, S., Penin, F., Dubuisson, J. and Voisset, C. (2007) The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein. *J Virol*, **81**, 8101-8111.
- Helle, F., Wychowski, C., Vu-Dac, N., Gustafson, K.R., Voisset, C. and Dubuisson, J. (2006) Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J Biol Chem*, **281**, 25177-25183.
- Hemler, M.E. (1998) Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 578-585.
- Hemler, M.E. (2001) Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol*, **155**, 1103-1107.
- Hemler, M.E. (2003) Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 397-422.
- Hemler, M.E. (2005) Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 801-811.
- Hemler, M.E., Mannon, B.A. and Berditchevski, F. (1996) Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1287**, 67-71.
- Higashiyama, S., Iwamoto, R., Goishi, K., Raab, G., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. and Mekada, E. (1995) The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *J Cell Biol*, **128**, 929-938.
- Higginbottom, A., Quinn, E.R., Kuo, C.C., Flint, M., Wilson, L.H., Bianchi, E., Nicosia, A., Monk, P.N., McKeating, J.A. and Levy, S. (2000) Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol*, **74**, 3642-3649.
- Higginbottom, A., Takahashi, Y., Bolling, L., Coonrod, S.A., White, J.M., Partridge, L.J. and Monk, P.N. (2003) Structural requirements for the inhibitory action of the CD9 large extracellular domain in sperm/oocyte binding and fusion. *Biochem Biophys Res Commun*, **311**, 208-214.
- Hijikata, M., Shimizu, Y.K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J.W., Alter, H.J., Purcell, R.H. and Yoshikura, H. (1993) Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol*, **67**, 1953-1958.
- Ho, S.H., Martin, F., Higginbottom, A., Partridge, L.J., Parthasarathy, V., Moseley, G.W., Lopez, P., Cheng-Mayer, C. and Monk, P.N. (2006) Recombinant extracellular domains of tetraspanin proteins are potent inhibitors of the infection of macrophages by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **80**, 6487-6496.
- Hollinger, F.B., Dolana, G., Thomas, W. and Gyorkey, F. (1984) Reduction in risk of hepatitis transmission by heat-treatment of a human Factor VIII concentrate. *J Infect Dis*, **150**, 250-262.
- Honda, M., Beard, M.R., Ping, L.H. and Lemon, S.M. (1999) A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol*, **73**, 1165-1174.
- Honda, M., Brown, E.A. and Lemon, S.M. (1996) Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *Rna*, **2**, 955-968.

- Hook, V.Y., Azaryan, A.V., Hwang, S.R. and Tezapsidis, N. (1994) Proteases and the emerging role of protease inhibitors in prohormone processing. *Faseb J*, **8**, 1269-1278.
- Hooper, K.P. and Eidels, L. (1995) Localization of a critical diphtheria toxin-binding domain to the C-terminus of the mature heparin-binding EGF-like growth factor region of the diphtheria toxin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **206**, 710-717.
- Hope, R.G. and McLauchlan, J. (2000) Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol*, **81**, 1913-1925.
- Hope, R.G., Murphy, D.J. and McLauchlan, J. (2002) The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem*, **277**, 4261-4270.
- Horvath, G., Serru, V., Clay, D., Billard, M., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (1998) CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J Biol Chem*, **273**, 30537-30543.
- Hosie, M.J., Willett, B.J., Dunsford, T.H., Jarrett, O. and Neil, J.C. (1993) A monoclonal antibody which blocks infection with feline immunodeficiency virus identifies a possible non-CD4 receptor. *J Virol*, **67**, 1667-1671.
- Hosui, A., Ohkawa, K., Ishida, H., Sato, A., Nakanishi, F., Ueda, K., Takehara, T., Kasahara, A., Sasaki, Y., Hori, M. and Hayashi, N. (2003) Hepatitis C virus core protein differently regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon-gamma stimuli. *J Biol Chem*, **278**, 28562-28571.
- Hotta, H., Ross, A.H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M.V., Ricciardi, R.P., Tsujimoto, Y., Croce, C.M. and Koprowski, H. (1988) Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res*, **48**, 2955-2962.
- Houghton, M. (1996) Hepatitis C viruses. In Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa, pp. 1035-1058.
- Houghton, M. and Abrignani, S. (2005) Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*, **436**, 961-966.
- Houghton, M., Weiner, A., Han, J., Kuo, G. and Choo, Q.L. (1991) Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, **14**, 381-388.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M. and McKeating, J.A. (2003) Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7271-7276.
- Hu, C.C., Liang, F.X., Zhou, G., Tu, L., Tang, C.H., Zhou, J., Kreibich, G. and Sun, T.T. (2005) Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking. *Mol Biol Cell*, **16**, 3937-3950.
- Huang, C.I., Kohno, N., Ogawa, E., Adachi, M., Taki, T. and Miyake, M. (1998) Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am J Pathol*, **153**, 973-983.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr. and Ye, J. (2007) Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 5848-5853.
- Huang, L., Hwang, J., Sharma, S.D., Hargittai, M.R., Chen, Y., Arnold, J.J., Raney, K.D. and Cameron, C.E. (2005a) Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem*, **280**, 36417-36428.
- Huang, S., Yuan, S., Dong, M., Su, J., Yu, C., Shen, Y., Xie, X., Yu, Y., Yu, X., Chen, S., Zhang, S., Pontarotti, P. and Xu, A. (2005b) The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics*, **86**, 674-684.
- Huang, Z., Murray, M.G. and Secrist, J.A., 3rd. (2006) Recent development of therapeutics for chronic HCV infection. *Antiviral Res*, **71**, 351-362.

- Hui, J.M., Kench, J., Farrell, G.C., Lin, R., Samarasinghe, D., Liddle, C., Byth, K. and George, J. (2002) Genotype-specific mechanisms for hepatic steatosis in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol Hepatol*, **17**, 873-881.
- Iacovacci, S., Manzin, A., Barca, S., Sargiacomo, M., Serafino, A., Valli, M.B., Macioce, G., Hassan, H.J., Ponzetto, A., Clementi, M., Peschle, C. and Carloni, G. (1997) Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. *Hepatology*, **26**, 1328-1337.
- Ikeda, M., Sugiyama, K., Mizutani, T., Tanaka, T., Tanaka, K., Sekihara, H., Shimotohno, K. and Kato, N. (1998) Human hepatocyte clonal cell lines that support persistent replication of hepatitis C virus. *Virus Res*, **56**, 157-167.
- Ikeda, M., Yi, M., Li, K. and Lemon, S.M. (2002) Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol*, **76**, 2997-3006.
- Ikeyama, S., Koyama, M., Yamaoko, M., Sasada, R. and Miyake, M. (1993) Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *J Exp Med*, **177**, 1231-1237.
- Ilan, E., Arazi, J., Nussbaum, O., Zauberman, A., Eren, R., Lubin, I., Neville, L., Ben-Moshe, O., Kischitzky, A., Litchi, A., Margalit, I., Gopher, J., Mounir, S., Cai, W., Daudi, N., Eid, A., Jurim, O., Czerniak, A., Galun, E. and Dagan, S. (2002) The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV. *J Infect Dis*, **185**, 153-161.
- Imai, T., Fukudome, K., Takagi, S., Nagira, M., Furuse, M., Fukuhara, N., Nishimura, M., Hinuma, Y. and Yoshie, O. (1992) C33 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T cell leukemia virus type 1-induced syncytium formation is a member of a new family of transmembrane proteins including CD9, CD37, CD53, and CD63. *J Immunol*, **149**, 2879-2886.
- Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M. and Yoshie, O. (1995) Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J Immunol*, **155**, 1229-1239.
- Imai, T. and Yoshie, O. (1993) C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells. *J Immunol*, **151**, 6470-6481.
- Indig, F.E., Diaz-Gonzalez, F. and Ginsberg, M.H. (1997) Analysis of the tetraspanin CD9-integrin alphaIIb beta3 (GPIIb-IIIa) complex in platelet membranes and transfected cells. *Biochem J*, **327 (Pt 1)**, 291-298.
- Ishido, S., Fujita, T. and Hotta, H. (1998) Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun*, **244**, 35-40.
- Ishii, M., Iwai, K., Koike, M., Ohshima, S., Kudo-Tanaka, E., Ishii, T., Mima, T., Katada, Y., Miyatake, K., Uchiyama, Y. and Saeki, Y. (2006) RANKL-induced expression of tetraspanin CD9 in lipid raft membrane microdomain is essential for cell fusion during osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*, **21**, 965-976.
- Israels, S.J. and McMillan-Ward, E.M. (2005) CD63 modulates spreading and tyrosine phosphorylation of platelets on immobilized fibrinogen. *Thromb Haemost*, **93**, 311-318.
- Israels, S.J., McMillan-Ward, E.M., Easton, J., Robertson, C. and McNicol, A. (2001) CD63 associates with the alphaIIb beta3 integrin-CD9 complex on the surface of activated platelets. *Thromb Haemost*, **85**, 134-141.
- Ito, T., Mukaigawa, J., Zuo, J., Hirabayashi, Y., Mitamura, K. and Yasui, K. (1996) Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *J Gen Virol*, **77 (Pt 5)**, 1043-1054.
- Ivashkina, N., Wolk, B., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H.E., Penin, F. and Moradpour, D. (2002) The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol*, **76**, 13088-13093.

- Iwamoto, R., Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. and Mekada, E. (1994) Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *Embo J*, **13**, 2322-2330.
- Jackel-Cram, C., Babiuk, L.A. and Liu, Q. (2007) Up-regulation of fatty acid synthase promoter by hepatitis C virus core protein: genotype-3a core has a stronger effect than genotype-1b core. *J Hepatol*, **46**, 999-1008.
- Jamshad, M., Rajesh, S., Stamataki, Z., McKeating, J.A., Dafforn, T., Overduin, M. and Bill, R.M. (2008) Structural characterization of recombinant human CD81 produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, **57**, 206-216.
- Jarmay, K., Karacsony, G., Nagy, A. and Schaff, Z. (2005) Changes in lipid metabolism in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*, **11**, 6422-6428.
- Jeong, S.H., Qiao, M., Nascimbeni, M., Hu, Z., Rehmann, B., Murthy, K. and Liang, T.J. (2004) Immunization with hepatitis C virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in nonhuman primates. *J Virol*, **78**, 6995-7003.
- Jhaveri, R., McHutchison, J., Patel, K., Qiang, G. and Diehl, A.M. (2008) Specific polymorphisms in hepatitis C virus genotype 3 core protein associated with intracellular lipid accumulation. *J Infect Dis*, **197**, 283-291.
- Jin, Y.H., Crispe, I.N. and Park, S. (2005) Expression of hepatitis C virus core protein in hepatocytes does not modulate proliferation or apoptosis of CD8+ T cells. *Yonsei Med J*, **46**, 827-834.
- Jolly, C. and Sattentau, Q.J. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J Virol*, **81**, 7873-7884.
- Jones, C.T., Murray, C.L., Eastman, D.K., Tassello, J. and Rice, C.M. (2007) Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol*, **81**, 8374-8383.
- Jones, P.H., Bishop, L.A. and Watt, F.M. (1996) Functional significance of CD9 association with beta 1 integrins in human epidermal keratinocytes. *Cell Adhes Commun*, **4**, 297-305.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M. and Sarnow, P. (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, **309**, 1577-1581.
- Jordan, R., Nikolaeva, O.V., Wang, L., Conyers, B., Mehta, A., Dwek, R.A. and Block, T.M. (2002) Inhibition of host ER glucosidase activity prevents Golgi processing of virion-associated bovine viral diarrhoea virus E2 glycoproteins and reduces infectivity of secreted virions. *Virology*, **295**, 10-19.
- Jung, K.K., Liu, X.W., Chirco, R., Fridman, R. and Kim, H.R. (2006) Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *Embo J*, **25**, 3934-3942.
- Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S. and Kohara, M. (1994) Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*, **75 (Pt 7)**, 1755-1760.
- Kaji, K., Oda, S., Miyazaki, S. and Kudo, A. (2002) Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Dev Biol*, **247**, 327-334.
- Kamegaya, Y., Hiasa, Y., Zukerberg, L., Fowler, N., Blackard, J.T., Lin, W., Choe, W.H., Schmidt, E.V. and Chung, R.T. (2005) Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, **41**, 660-667.
- Kanda, T., Steele, R., Ray, R. and Ray, R.B. (2007) Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *J Virol*, **81**, 669-676.

- Kantor, A.B., Deng, J., Waubant, E., Lin, H., Becker, C.H., Lacy, J.R., Perrone, A.M., Bennett, D. and Goelz, S.E. (2007) Identification of short-term pharmacodynamic effects of interferon-beta-1a in multiple sclerosis subjects with broad-based phenotypic profiling. *J Neuroimmunol*, **188**, 103-116.
- Kao, C.F., Chen, S.Y., Chen, J.Y. and Wu Lee, Y.H. (2004) Modulation of p53 transcription regulatory activity and post-translational modification by hepatitis C virus core protein. *Oncogene*, **23**, 2472-2483.
- Kapadia, S.B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J.A. and Chisari, F.V. (2007) Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol*, **81**, 374-383.
- Karayiannis, P. and McGarvey, M.J. (1995) The GB hepatitis viruses. *J Viral Hepat*, **2**, 221-226.
- Karayiannis, P., Scheuer, P.J., Bamber, M., Cohn, D., Hurn, B.A. and Thomas, H.C. (1983) Experimental infection of Tamarins with human non-A, non-B hepatitis virus. *J Med Virol*, **11**, 251-256.
- Karlson, U., Pejler, G., Froman, G. and Hellman, L. (2002) Rat mast cell protease 4 is a beta-chymase with unusually stringent substrate recognition profile. *J Biol Chem*, **277**, 18579-18585.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M. and Wakita, T. (2003) Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, **125**, 1808-1817.
- Kato, T., Matsumura, T., Heller, T., Saito, S., Sapp, R.K., Murthy, K., Wakita, T. and Liang, T.J. (2007) Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J Virol*, **81**, 4405-4411.
- Kazarov, A.R., Yang, X., Stipp, C.S., Sehgal, B. and Hemler, M.E. (2002) An extracellular site on tetraspanin CD151 determines alpha 3 and alpha 6 integrin-dependent cellular morphology. *J Cell Biol*, **158**, 1299-1309.
- Keck, Z.Y., Sung, V.M., Perkins, S., Rowe, J., Paul, S., Liang, T.J., Lai, M.M. and Fong, S.K. (2004) Human monoclonal antibody to hepatitis C virus E1 glycoprotein that blocks virus attachment and viral infectivity. *J Virol*, **78**, 7257-7263.
- Keenan, C. and Kelleher, D. (1998) Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cell Signal*, **10**, 225-232.
- Kelic, S., Levy, S., Suarez, C. and Weinstein, D.E. (2001) CD81 regulates neuron-induced astrocyte cell-cycle exit. *Mol Cell Neurosci*, **17**, 551-560.
- Keller, C.A., Yuan, X., Panzanelli, P., Martin, M.L., Aldred, M., Sassoe-Pognetto, M. and Luscher, B. (2004) The gamma2 subunit of GABA(A) receptors is a substrate for palmitoylation by GODZ. *J Neurosci*, **24**, 5881-5891.
- Kettner, S., Kalthoff, F., Graf, P., Priller, E., Kricsek, F., Lindley, I. and Schweighoffer, T. (2007) EWI-2/CD316 is an inducible receptor of HSPA8 on human dendritic cells. *Mol Cell Biol*, **27**, 7718-7726.
- Khurana, S., Kremmentsov, D.N., de Parseval, A., Elder, J.H., Foti, M. and Thali, M. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 and influenza virus exit via different membrane microdomains. *J Virol*, **81**, 12630-12640.
- Kim, K.H., Hong, S.P., Kim, K., Park, M.J., Kim, K.J. and Cheong, J. (2007) HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun*, **355**, 883-888.
- Kim, S., Jeon, T.J., Oberai, A., Yang, D., Schmidt, J.J. and Bowie, J.U. (2005) Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 14278-14283.
- Kim, Y.K., Kim, C.S., Lee, S.H. and Jang, S.K. (2002) Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun*, **290**, 105-112.
- Kitadokoro, K., Bordo, D., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Abrignani, S., Grandi, G. and Bolognesi, M. (2001) CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *Embo J*, **20**, 12-18.

- Knobeloch, K.P., Wright, M.D., Ochsenbein, A.F., Liesenfeld, O., Lohler, J., Zinkernagel, R.M., Horak, I. and Orinska, Z. (2000) Targeted inactivation of the tetraspanin CD37 impairs T-cell-dependent B-cell response under suboptimal costimulatory conditions. *Mol Cell Biol*, **20**, 5363-5369.
- Kohl, S., Christ-Adler, M., Apfelstedt-Sylla, E., Kellner, U., Eckstein, A., Zrenner, E. and Wissinger, B. (1997) RDS/peripherin gene mutations are frequent causes of central retinal dystrophies. *J Med Genet*, **34**, 620-626.
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D. and Rapp, U.R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, **364**, 249-252.
- Kolesnikova, T.V., Stipp, C.S., Rao, R.M., Lane, W.S., Luscinskas, F.W. and Hemler, M.E. (2004) EWI-2 modulates lymphocyte integrin alpha4beta1 functions. *Blood*, **103**, 3013-3019.
- Kolykhalov, A.A., Agapov, E.V., Blight, K.J., Mihalik, K., Feinstone, S.M. and Rice, C.M. (1997) Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, **277**, 570-574.
- Kolykhalov, A.A., Feinstone, S.M. and Rice, C.M. (1996) Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol*, **70**, 3363-3371.
- Komurian-Pradel, F., Rajoharison, A., Berland, J.L., Khouri, V., Perret, M., Van Roosmalen, M., Pol, S., Negro, F. and Paranhos-Baccala, G. (2004) Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, **40**, 900-909.
- Koppel, E.A., van Gisbergen, K.P., Geijtenbeek, T.B. and van Kooyk, Y. (2005) Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. *Cell Microbiol*, **7**, 157-165.
- Koutsoudakis, G., Herrmann, E., Kallis, S., Bartenschlager, R. and Pietschmann, T. (2007) The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol*, **81**, 588-598.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T. and Bartenschlager, R. (2006) Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol*, **80**, 5308-5320.
- Kovalenko, O.V., Yang, X., Kolesnikova, T.V. and Hemler, M.E. (2004) Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking. *Biochem J*, **377**, 407-417.
- Kovalenko, O.V., Yang, X.H. and Hemler, M.E. (2007) A novel cysteine cross-linking method reveals a direct association between claudin-1 and tetraspanin CD9. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 1855-1867.
- Koziel, M.J. (2006) NK cells: natural born killers in the conflict between humans and HCV. *Hepatology*, **43**, 395-397.
- Koziel, M.J., Dudley, D., Afdhal, N., Choo, Q.L., Houghton, M., Ralston, R. and Walker, B.D. (1993) Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *J Virol*, **67**, 7522-7532.
- Koziel, M.J., Dudley, D., Wong, J.T., Dienstag, J., Houghton, M., Ralston, R. and Walker, B.D. (1992) Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol*, **149**, 3339-3344.
- Krieger, N., Lohmann, V. and Bartenschlager, R. (2001) Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol*, **75**, 4614-4624.
- Kropshofer, H., Spindeldreher, S., Rohn, T.A., Platania, N., Grygar, C., Daniel, N., Wolpl, A., Langen, H., Horejsi, V. and Vogt, A.B. (2002) Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nat Immunol*, **3**, 61-68.
- Lagaudriere-Gesbert, C., Lebel-Binay, S., Hubeau, C., Fradelizi, D. and Conjeaud, H. (1998) Signaling through the tetraspanin CD82 triggers its association with the cytoskeleton leading to sustained morphological changes and T cell activation. *Eur J Immunol*, **28**, 4332-4344.

- Lagaudriere-Gesbert, C., Lebel-Binay, S., Wiertz, E., Ploegh, H.L., Fradelizi, D. and Conjeaud, H. (1997) The tetraspanin protein CD82 associates with both free HLA class I heavy chain and heterodimeric beta 2-microglobulin complexes. *J Immunol*, **158**, 2790-2797.
- Lagging, L.M., Meyer, K., Owens, R.J. and Ray, R. (1998) Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *J Virol*, **72**, 3539-3546.
- Lai, W.K., Sun, P.J., Zhang, J., Jennings, A., Lalor, P.F., Hubscher, S., McKeating, J.A. and Adams, D.H. (2006) Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on human sinusoidal endothelium: a role for capturing hepatitis C virus particles. *Am J Pathol*, **169**, 200-208.
- Lam, A.M. and Frick, D.N. (2006) Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *J Virol*, **80**, 404-411.
- Lamarre, D., Anderson, P.C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P., Bos, M., Cameron, D.R., Cartier, M., Cordingley, M.G., Faucher, A.M., Goudreau, N., Kawai, S.H., Kukolj, G., Lagace, L., LaPlante, S.R., Narjes, H., Poupart, M.A., Rancourt, J., Sentjens, R.E., St George, R., Simoneau, B., Steinmann, G., Thibeault, D., Tsantrizos, Y.S., Weldon, S.M., Yong, C.L. and Llinas-Brunet, M. (2003) An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*, **426**, 186-189.
- Lambot, M., Fretier, S., Op De Beeck, A., Quatannens, B., Lestavel, S., Clavey, V. and Dubuisson, J. (2002) Reconstitution of hepatitis C virus envelope glycoproteins into liposomes as a surrogate model to study virus attachment. *J Biol Chem*, **277**, 20625-20630.
- Lammerding, J., Kazarov, A.R., Huang, H., Lee, R.T. and Hemler, M.E. (2003) Tetraspanin CD151 regulates alpha6beta1 integrin adhesion strengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7616-7621.
- Lanford, R.E., Sureau, C., Jacob, J.R., White, R. and Fuerst, T.R. (1994) Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology*, **202**, 606-614.
- Lange, Y. and Steck, T.L. (1998) Four cholesterol-sensing proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **8**, 435-439.
- Latysheva, N., Muratov, G., Rajesh, S., Padgett, M., Hotchin, N.A., Overduin, M. and Berditchevski, F. (2006) Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63. *Mol Cell Biol*, **26**, 7707-7718.
- Lau, L.M., Wee, J.L., Wright, M.D., Moseley, G.W., Hogarth, P.M., Ashman, L.K. and Jackson, D.E. (2004) The tetraspanin superfamily member CD151 regulates outside-in integrin alphaIIb beta3 signaling and platelet function. *Blood*, **104**, 2368-2375.
- Lauer, G.M., Barnes, E., Lucas, M., Timm, J., Ouchi, K., Kim, A.Y., Day, C.L., Robbins, G.K., Casson, D.R., Reiser, M., Dusheiko, G., Allen, T.M., Chung, R.T., Walker, B.D. and Klenerman, P. (2004) High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, **127**, 924-936.
- Lauer, G.M., Ouchi, K., Chung, R.T., Nguyen, T.N., Day, C.L., Purkis, D.R., Reiser, M., Kim, A.Y., Lucas, M., Klenerman, P. and Walker, B.D. (2002) Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol*, **76**, 6104-6113.
- Lavie, M., Goffard, A. and Dubuisson, J. (2007) Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr Issues Mol Biol*, **9**, 71-86.
- Lavie, M., Voisset, C., Vu-Dac, N., Zurawski, V., Duverlie, G., Wychowski, C. and Dubuisson, J. (2006) Serum amyloid A has antiviral activity against hepatitis C virus by inhibiting virus entry in a cell culture system. *Hepatology*, **44**, 1626-1634.
- Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F.L., Penin, F. and Pecheur, E.I. (2006) Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem*, **281**, 3909-3917.

- Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B., Pawlotsky, J.M. and Cosset, F.L. (2005a) Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *J Virol*, **79**, 6023-6034.
- Lavillette, D., Pecheur, E.I., Donot, P., Fresquet, J., Molle, J., Corbau, R., Dreux, M., Penin, F. and Cosset, F.L. (2007) Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J Virol*, **81**, 8752-8765.
- Lavillette, D., Tarr, A.W., Voisset, C., Donot, P., Bartosch, B., Bain, C., Patel, A.H., Dubuisson, J., Ball, J.K. and Cosset, F.L. (2005b) Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology*, **41**, 265-274.
- Lawitz, E., Rodriguez-Torres, M., Muir, A.J., Kieffer, T.L., McNair, L., Khunvichai, A. and McHutchison, J.G. (2008) Antiviral effects and safety of telaprevir, peginterferon alfa-2a, and ribavirin for 28 days in hepatitis C patients. *J Hepatol*.
- Le Naour, F., Andre, M., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2006) Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics*, **6**, 6447-6454.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M. and Boucheix, C. (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*, **287**, 319-321.
- Lechner, F., Wong, D.K., Dunbar, P.R., Chapman, R., Chung, R.T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P. and Walker, B.D. (2000) Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med*, **191**, 1499-1512.
- Legrand-Abravanel, F., Claudinon, J., Nicot, F., Dubois, M., Chapuy-Regaud, S., Sandres-Saune, K., Pasquier, C. and Izopet, J. (2007) New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J Virol*, **81**, 4357-4362.
- Lemon, S.M., Walker, C., Alter, M.J. and Yi, M. (2007) Hepatitis C Virus. In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Vol. 1, pp. 1253-1304.
- Lemon, S.M.W., C.; Alter M. J.; Yi M. (2007) *Hepatitis C Virus*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Lerat, H., Honda, M., Beard, M.R., Loesch, K., Sun, J., Yang, Y., Okuda, M., Gosert, R., Xiao, S.Y., Weinman, S.A. and Lemon, S.M. (2002) Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology*, **122**, 352-365.
- Lerat, H., Rumin, S., Habersetzer, F., Berby, F., Trabaud, M.A., Trepo, C. and Inchauspe, G. (1998) In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood*, **91**, 3841-3849.
- Lerat, H., Shimizu, Y.K. and Lemon, S.M. (2000) Cell type-specific enhancement of hepatitis C virus internal ribosome entry site-directed translation due to 5' nontranslated region substitutions selected during passage of virus in lymphoblastoid cells. *J Virol*, **74**, 7024-7031.
- Levy, S., Nguyen, V.Q., Andria, M.L. and Takahashi, S. (1991) Structure and membrane topology of TAPA-1. *J Biol Chem*, **266**, 14597-14602.
- Levy, S. and Shoham, T. (2005a) Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)*, **20**, 218-224.
- Levy, S. and Shoham, T. (2005b) Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)*, **20**, 218-224.
- Levy, S. and Shoham, T. (2005c) The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol*, **5**, 136-148.
- Levy, S., Todd, S.C. and Maecker, H.T. (1998) CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol*, **16**, 89-109.

- Lin, C., Gates, C.A., Rao, B.G., Brennan, D.L., Fulghum, J.R., Luong, Y.P., Frantz, J.D., Lin, K., Ma, S., Wei, Y.Y., Perni, R.B. and Kwong, A.D. (2005) In vitro studies of cross-resistance mutations against two hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061. *J Biol Chem*, **280**, 36784-36791.
- Lin, C., Lin, K., Luong, Y.P., Rao, B.G., Wei, Y.Y., Brennan, D.L., Fulghum, J.R., Hsiao, H.M., Ma, S., Maxwell, J.P., Cottrell, K.M., Perni, R.B., Gates, C.A. and Kwong, A.D. (2004a) In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J Biol Chem*, **279**, 17508-17514.
- Lin, C., Lindenbach, B.D., Pragai, B.M., McCourt, D.W. and Rice, C.M. (1994) Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol*, **68**, 5063-5073.
- Lin, K., Kwong, A.D. and Lin, C. (2004b) Combination of a hepatitis C virus NS3-NS4A protease inhibitor and alpha interferon synergistically inhibits viral RNA replication and facilitates viral RNA clearance in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 4784-4792.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A. and Rice, C.M. (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, **309**, 623-626.
- Lindenbach, B.D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghe, T., Syder, A.J., McKeating, J.A., Lanford, R.E., Feinstone, S.M., Major, M.E., Leroux-Roels, G. and Rice, C.M. (2006) Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3805-3809.
- Lindenbach, B.D. and Rice, C.M. (2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, **436**, 933-938.
- Little, K.D., Hemler, M.E. and Stipp, C.S. (2004) Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Galpha q/11 association. *Mol Biol Cell*, **15**, 2375-2387.
- Liu, L., He, B., Liu, W.M., Zhou, D., Cox, J.V. and Zhang, X.A. (2007) Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking. *J Biol Chem*, **282**, 31631-31642.
- Liu, Q., Bhat, R.A., Prince, A.M. and Zhang, P. (1999) The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, **254**, 572-577.
- Lo, S.Y., Masiarz, F., Hwang, S.B., Lai, M.M. and Ou, J.H. (1995) Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology*, **213**, 455-461.
- Lo, S.Y., Selby, M., Tong, M. and Ou, J.H. (1994) Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino acid substitution. *Virology*, **199**, 124-131.
- Loffler, S., Lottspeich, F., Lanza, F., Azorsa, D.O., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (1997) CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J Virol*, **71**, 42-49.
- Logvinoff, C., Major, M.E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S.M., Alter, H., Rice, C.M. and McKeating, J.A. (2004) Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10149-10154.
- Lohmann, V., Korner, F., Dobierzewska, A. and Bartenschlager, R. (2001) Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol*, **75**, 1437-1449.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. and Bartenschlager, R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, **285**, 110-113.
- Loo, Y.M., Owen, D.M., Li, K., Erickson, A.K., Johnson, C.L., Fish, P.M., Carney, D.S., Wang, T., Ishida, H., Yoneyama, M., Fujita, T., Saito, T., Lee, W.M., Hagedorn, C.H., Lau, D.T., Weinman, S.A., Lemon, S.M. and Gale, M., Jr. (2006) Viral and therapeutic

- control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6001-6006.
- Lorenz, I.C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T.G. and Rice, C.M. (2006) Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature*, **442**, 831-835.
- Louvet-Vallee, S. (2000) ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol Cell*, **92**, 305-316.
- Lozach, P.Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F.L. and Altmeyer, R. (2004) C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem*, **279**, 32035-32045.
- Lozach, P.Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Fong, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F. and Altmeyer, R. (2003) DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem*, **278**, 20358-20366.
- Lucas, M., Vargas-Cuero, A.L., Lauer, G.M., Barnes, E., Willberg, C.B., Semmo, N., Walker, B.D., Phillips, R. and Klenerman, P. (2004) Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8+ T cells. *J Immunol*, **172**, 1744-1753.
- Lundin, M., Monne, M., Widell, A., Von Heijne, G. and Persson, M.A. (2003) Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol*, **77**, 5428-5438.
- Ma, H., Leveque, V., De Witte, A., Li, W., Hendricks, T., Clausen, S.M., Cammack, N. and Klumpp, K. (2005) Inhibition of native hepatitis C virus replicase by nucleotide and non-nucleoside inhibitors. *Virology*, **332**, 8-15.
- Ma, H.C., Lin, T.W., Li, H., Iguchi-Arigo, S.M., Ariga, H., Chuang, Y.L., Ou, J.H. and Lo, S.Y. (2008) Hepatitis C virus ARFP/F protein interacts with cellular MM-1 protein and enhances the gene trans-activation activity of c-Myc. *J Biomed Sci*, **15**, 417-425.
- Machida, K., Cheng, K.T., Sung, V.M., Levine, A.M., Fong, S. and Lai, M.M. (2006) Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *J Virol*, **80**, 866-874.
- Maecker, H.T., Do, M.S. and Levy, S. (1998) CD81 on B cells promotes interleukin 4 secretion and antibody production during T helper type 2 immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2458-2462.
- Maecker, H.T. and Levy, S. (1997) Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. *J Exp Med*, **185**, 1505-1510.
- Maecker, H.T., Todd, S.C., Kim, E.C. and Levy, S. (2000) Differential expression of murine CD81 highlighted by new anti-mouse CD81 monoclonal antibodies. *Hybridoma*, **19**, 15-22.
- Maier, L.M., Smyth, D.J., Vella, A., Payne, F., Cooper, J.D., Pask, R., Lowe, C., Hulme, J., Smink, L.J., Fraser, H., Moule, C., Hunter, K.M., Chamberlain, G., Walker, N., Nutland, S., Undlien, D.E., Ronningen, K.S., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Savage, D.A., Strachan, D.P., Peterson, L.B., Todd, J.A., Wicker, L.S. and Twells, R.C. (2005) Construction and analysis of tag single nucleotide polymorphism maps for six human-mouse orthologous candidate genes in type 1 diabetes. *BMC Genet*, **6**, 9.
- Maillard, P., Huby, T., Andreo, U., Moreau, M., Chapman, J. and Budkowska, A. (2006) The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *Faseb J*, **20**, 735-737.
- Maillard, P., Krawczynski, K., Nitkiewicz, J., Bronnert, C., Sidorkiewicz, M., Gounon, P., Dubuisson, J., Faure, G., Crainic, R. and Budkowska, A. (2001) Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol*, **75**, 8240-8250.
- Major, M.E., Mihalik, K., Puig, M., Rehmann, B., Nascimbeni, M., Rice, C.M. and Feinstone, S.M. (2002) Previously infected and recovered chimpanzees exhibit rapid responses that control hepatitis C virus replication upon rechallenge. *J Virol*, **76**, 6586-6595.
- Malcolm, B.A., Liu, R., Lahser, F., Agrawal, S., Belanger, B., Butkiewicz, N., Chase, R., Gheyas, F., Hart, A., Hesk, D., Ingravallo, P., Jiang, C., Kong, R., Lu, J., Pichardo, J.,

- Prongay, A., Skelton, A., Tong, X., Venkatraman, S., Xia, E., Girijavallabhan, V. and Njoroge, F.G. (2006) SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 1013-1020.
- Mannion, B.A., Berditchevski, F., Kraeft, S.K., Chen, L.B. and Hemler, M.E. (1996) Transmembrane-4 superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63, and CD53 specifically associated with integrin alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29). *J Immunol*, **157**, 2039-2047.
- Martinot-Peignoux, M., Roudot-Thoraval, F., Mendel, I., Coste, J., Izopet, J., Duverlie, G., Payan, C., Pawlotsky, J.M., Defer, C., Bogard, M., Gerolami, V., Halfon, P., Buisson, Y., Fouqueray, B., Loiseau, P., Lamoril, J., Lefrere, J.J. and Marcellin, P. (1999) Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. The GEMHEP. *J Viral Hepat*, **6**, 435-443.
- Martyn, J.C., Dong, X., Holmes-Brown, S., Pribul, P., Li, S., Drummer, H.E. and Gowans, E.J. (2007) Transient and stable expression of the HCV envelope glycoproteins in cell lines and primary hepatocytes transduced with a recombinant baculovirus. *Arch Virol*, **152**, 329-343.
- Masciopinto, F., Campagnoli, S., Abrignani, S., Uematsu, Y. and Pileri, P. (2001) The small extracellular loop of CD81 is necessary for optimal surface expression of the large loop, a putative HCV receptor. *Virus Res*, **80**, 1-10.
- Masciopinto, F., Freer, G., Burgio, V.L., Levy, S., Galli-Stampino, L., Bendinelli, M., Houghton, M., Abrignani, S. and Uematsu, Y. (2002) Expression of human CD81 in transgenic mice does not confer susceptibility to hepatitis C virus infection. *Virology*, **304**, 187-196.
- Masciopinto, F., Giovani, C., Campagnoli, S., Galli-Stampino, L., Colombatto, P., Brunetto, M., Yen, T.S., Houghton, M., Pileri, P. and Abrignani, S. (2004) Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur J Immunol*, **34**, 2834-2842.
- Masellis-Smith, A., Jensen, G.S., Seehafer, J.G., Slupsky, J.R. and Shaw, A.R. (1990) Anti-CD9 monoclonal antibodies induce homotypic adhesion of pre-B cell lines by a novel mechanism. *J Immunol*, **144**, 1607-1613.
- Matsuo, E., Tani, H., Lim, C., Komoda, Y., Okamoto, T., Miyamoto, H., Moriishi, K., Yagi, S., Patel, A.H., Miyamura, T. and Matsuura, Y. (2006) Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line by a recombinant baculovirus. *Biochem Biophys Res Commun*, **340**, 200-208.
- Matsuura, Y., Tani, H., Suzuki, K., Kimura-Someya, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Ishii, K., Moriishi, K., Robison, C.S., Whitt, M.A. and Miyamura, T. (2001) Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology*, **286**, 263-275.
- Maurer, C.A., Graber, H.U., Friess, H., Beyermann, B., Willi, D., Netzer, P., Zimmermann, A. and Buchler, M.W. (1999) Reduced expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in advanced colon cancer and its metastases. *Surgery*, **126**, 869-880.
- Mawhorter, S.D., Stephany, D.A., Ottesen, E.A. and Nutman, T.B. (1996) Identification of surface molecules associated with physiologic activation of eosinophils. Application of whole-blood flow cytometry to eosinophils. *J Immunol*, **156**, 4851-4858.
- Mazurov, D., Heidecker, G. and Derse, D. (2006) HTLV-1 Gag protein associates with CD82 tetraspanin microdomains at the plasma membrane. *Virology*, **346**, 194-204.
- Mazurov, D., Heidecker, G. and Derse, D. (2007) The inner loop of tetraspanins CD82 and CD81 mediates interactions with human T cell lymphotropic virus type 1 Gag protein. *J Biol Chem*, **282**, 3896-3903.
- McCaffrey, K., Boo, I., Pountourios, P. and Drummer, H.E. (2007) Expression and characterization of a minimal hepatitis C virus glycoprotein E2 core domain that retains CD81 binding. *J Virol*, **81**, 9584-9590.
- McCormick, C.J., Rowlands, D.J. and Harris, M. (2002) Efficient delivery and regulable expression of hepatitis C virus full-length and minigenome constructs in hepatocyte-derived cell lines using baculovirus vectors. *J Gen Virol*, **83**, 383-394.

- McKeating, J.A., Zhang, L.Q., Logvinoff, C., Flint, M., Zhang, J., Yu, J., Butera, D., Ho, D.D., Dustin, L.B., Rice, C.M. and Balfe, P. (2004) Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *J Virol*, **78**, 8496-8505.
- McLauchlan, J. (2000) Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat*, **7**, 2-14.
- McLauchlan, J., Lemberg, M.K., Hope, G. and Martoglio, B. (2002) Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *Embo J*, **21**, 3980-3988.
- McMullan, L.K., Grakoui, A., Evans, M.J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A.D., Feinstone, S.M. and Rice, C.M. (2007) Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2879-2884.
- Mee, C.J., Grove, J., Harris, H.J., Hu, K., Balfe, P. and McKeating, J.A. (2008) Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry. *J Virol*, **82**, 461-470.
- Meerloo, T., Sheikh, M.A., Bloem, A.C., de Ronde, A., Schutten, M., van Els, C.A., Roholl, P.J., Joling, P., Goudsmit, J. and Schuurman, H.J. (1993) Host cell membrane proteins on human immunodeficiency virus type 1 after in vitro infection of H9 cells and blood mononuclear cells. An immuno-electron microscopic study. *J Gen Virol*, **74** (Pt 1), 129-135.
- Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F.L. and Dragic, T. (2008) The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol*, **82**, 3555-3560.
- Meertens, L., Bertaux, C. and Dragic, T. (2006) Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol*, **80**, 11571-11578.
- Mellor, J., Holmes, E.C., Jarvis, L.M., Yap, P.L. and Simmonds, P. (1995) Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol*, **76** (Pt 10), 2493-2507.
- Memon, M.I. and Memon, M.A. (2002) Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat*, **9**, 84-100.
- Meola, A., Sbardellati, A., Bruni Ercole, B., Cerretani, M., Pezzanera, M., Ceccacci, A., Vitelli, A., Levy, S., Nicosia, A., Traboni, C., McKeating, J. and Scarselli, E. (2000) Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection. *J Virol*, **74**, 5933-5938.
- Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., Tyrrell, D.L. and Kneteman, N.M. (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med*, **7**, 927-933.
- Mercer, J. and Helenius, A. (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*, **320**, 531-535.
- Meunier, J.C., Engle, R.E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S.U., Cosset, F.L., Purcell, R.H. and Bukh, J. (2005) Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4560-4565.
- Meyer, K., Basu, A. and Ray, R. (2000) Functional features of hepatitis C virus glycoproteins for pseudotype virus entry into mammalian cells. *Virology*, **276**, 214-226.
- Michalak, J.P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J.C., Ung, S., Rice, C.M. and Dubuisson, J. (1997) Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol*, **78** (Pt 9), 2299-2306.
- Miller, K., McArdle, S., Gale, M.J., Jr., Geller, D.A., Tenoever, B., Hiscott, J., Gretch, D.R. and Polyak, S.J. (2004) Effects of the hepatitis C virus core protein on innate cellular defense pathways. *J Interferon Cytokine Res*, **24**, 391-402.
- Miller, R.H. and Purcell, R.H. (1990) Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 2057-2061.

- Min, G., Wang, H., Sun, T.T. and Kong, X.P. (2006) Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-Å resolution. *J Cell Biol*, **173**, 975-983.
- Mitamura, T., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. and Mekada, E. (1995) Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J Biol Chem*, **270**, 1015-1019.
- Mittelbrunn, M., Yanez-Mo, M., Sancho, D., Ursa, A. and Sanchez-Madrid, F. (2002) Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *J Immunol*, **169**, 6691-6695.
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M. and Mekada, E. (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, **287**, 321-324.
- Miyake, K., Weissman, I.L., Greenberger, J.S. and Kincade, P.W. (1991) Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med*, **173**, 599-607.
- Miyake, M., Adachi, M., Huang, C., Higashiyama, M., Kodama, K. and Taki, T. (1999) A novel molecular staging protocol for non-small cell lung cancer. *Oncogene*, **18**, 2397-2404.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. and Shimotohno, K. (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*, **9**, 1089-1097.
- Miyazaki, T., Muller, U. and Campbell, K.S. (1997) Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. *Embo J*, **16**, 4217-4225.
- Mo, H., Lu, L., Pilot-Matias, T., Pithawalla, R., Mondal, R., Masse, S., Dekhtyar, T., Ng, T., Koev, G., Stoll, V., Stewart, K.D., Pratt, J., Donner, P., Rockway, T., Maring, C. and Molla, A. (2005) Mutations conferring resistance to a hepatitis C virus (HCV) RNA-dependent RNA polymerase inhibitor alone or in combination with an HCV serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 4305-4314.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Graber, P., Ghera, P., Smolarsky, M., Funaro, A., Malavasi, F., Larrey, D., Coste, J., Fabre, J.M., Sa-Cunha, A. and Maurel, P. (2007) The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol*, **46**, 411-419.
- Molina, S., Castet, V., Pichard-Garcia, L., Wychowski, C., Meurs, E., Pascussi, J.M., Sureau, C., Fabre, J.M., Sacunha, A., Larrey, D., Dubuisson, J., Coste, J., McKeating, J., Maurel, P. and Fournier-Wirth, C. (2008) Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol*, **82**, 569-574.
- Monazahian, M., Bohme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S. and Thomssen, R. (1999) Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol*, **57**, 223-229.
- Monazahian, M., Kippenberger, S., Muller, A., Seitz, H., Bohme, I., Grethe, S. and Thomssen, R. (2000) Binding of human lipoproteins (low, very low, high density lipoproteins) to recombinant envelope proteins of hepatitis C virus. *Med Microbiol Immunol*, **188**, 177-184.
- Mondelli, M.U., Cerino, A., Meola, A. and Nicosia, A. (2003) Variability or conservation of hepatitis C virus hypervariable region 1? Implications for immune responses. *J Biosci*, **28**, 305-310.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., Faló, L.D., Jr. and Thomson, A.W. (2004) Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, **104**, 3257-3266.
- Morikawa, K., Zhao, Z., Date, T., Miyamoto, M., Murayama, A., Akazawa, D., Tanabe, J., Sone, S. and Wakita, T. (2007) The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol*, **79**, 714-723.

- Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T. and Koike, K. (1998) The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med*, **4**, 1065-1067.
- Moriya, K., Nakagawa, K., Santa, T., Shintani, Y., Fujie, H., Miyoshi, H., Tsutsumi, T., Miyazawa, T., Ishibashi, K., Horie, T., Imai, K., Todoroki, T., Kimura, S. and Koike, K. (2001) Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, **61**, 4365-4370.
- Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Miyamura, T. and Koike, K. (1997) Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol*, **78 (Pt 7)**, 1527-1531.
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V. and Rodriguez, A. (2001) Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science*, **291**, 141-144.
- Murakami, K., Abe, M., Kageyama, T., Kamoshita, N. and Nomoto, A. (2001) Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch Virol*, **146**, 729-741.
- Muratori, L., Gibellini, D., Lenzi, M., Cataleta, M., Muratori, P., Morelli, M.C. and Bianchi, F.B. (1996) Quantification of hepatitis C virus-infected peripheral blood mononuclear cells by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood*, **88**, 2768-2774.
- Murayama, Y., Miyagawa, J., Oritani, K., Yoshida, H., Yamamoto, K., Kishida, O., Miyazaki, T., Tsutsui, S., Kiyohara, T., Miyazaki, Y., Higashiyama, S., Matsuzawa, Y. and Shinomura, Y. (2004) CD9-mediated activation of the p46 Shc isoform leads to apoptosis in cancer cells. *J Cell Sci*, **117**, 3379-3388.
- Nagira, M., Imai, T., Ishikawa, I., Uwabe, K.I. and Yoshie, O. (1994) Mouse homologue of C33 antigen (CD82), a member of the transmembrane 4 superfamily: complementary DNA, genomic structure, and expression. *Cell Immunol*, **157**, 144-157.
- Naglich, J.G., Metherall, J.E., Russell, D.W. and Eidels, L. (1992) Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell*, **69**, 1051-1061.
- Nahmias, Y., Casali, M., Barbe, L., Berthiaume, F. and Yarmush, M.L. (2006) Liver endothelial cells promote LDL-R expression and the uptake of HCV-like particles in primary rat and human hepatocytes. *Hepatology*, **43**, 257-265.
- Nakamura, K., Mitamura, T., Takahashi, T., Kobayashi, T. and Mekada, E. (2000) Importance of the major extracellular domain of CD9 and the epidermal growth factor (EGF)-like domain of heparin-binding EGF-like growth factor for up-regulation of binding and activity. *J Biol Chem*, **275**, 18284-18290.
- Nakayama, K. (1997) Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J*, **327 (Pt 3)**, 625-635.
- Nattermann, J., Feldmann, G., Ahlenstiel, G., Langhans, B., Sauerbruch, T. and Spengler, U. (2006) Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut*, **55**, 869-877.
- Navas, M.C., Fuchs, A., Schvoerer, E., Bohbot, A., Aubertin, A.M. and Stoll-Keller, F. (2002) Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol*, **67**, 152-161.
- Neddermann, P., Quintavalle, M., Di Pietro, C., Clementi, A., Cerretani, M., Altamura, S., Bartholomew, L. and De Francesco, R. (2004) Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J Virol*, **78**, 13306-13314.
- Negro, F. (2006) Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, **12**, 6756-6765.
- Nelson, D.R., Marousis, C.G., Ohno, T., Davis, G.L. and Lau, J.Y. (1998) Intrahepatic hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity and response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology*, **28**, 225-230.

- Neumann, A.U., Lam, N.P., Dahari, H., Gretch, D.R., Wiley, T.E., Layden, T.J. and Perelson, A.S. (1998) Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*, **282**, 103-107.
- Nevens, F., Roskams, T., Van Vlierberghe, H., Horsmans, Y., Sprengers, D., Elewaut, A., Desmet, V., Leroux-Roels, G., Quinaux, E., Depla, E., Dincq, S., Vander Stichele, C., Maertens, G. and Hulstaert, F. (2003) A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, **38**, 1289-1296.
- Nguyen, H., Sankaran, S. and Dandekar, S. (2006) Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes. *Virology*, **354**, 58-68.
- Nguyen, T.T., Gates, A.T., Gutshall, L.L., Johnston, V.K., Gu, B., Duffy, K.J. and Sarisky, R.T. (2003) Resistance profile of a hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase benzothiadiazine inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 3525-3530.
- Nielsen, S.U., Bassendine, M.F., Burt, A.D., Martin, C., Pumeechockchai, W. and Toms, G.L. (2006) Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol*, **80**, 2418-2428.
- Nishiuchi, R., Sanzen, N., Nada, S., Sumida, Y., Wada, Y., Okada, M., Takagi, J., Hasegawa, H. and Sekiguchi, K. (2005) Potentiation of the ligand-binding activity of integrin alpha3beta1 via association with tetraspanin CD151. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1939-1944.
- Noppornpanth, S., Lien, T.X., Poovorawan, Y., Smits, S.L., Osterhaus, A.D. and Haagmans, B.L. (2006) Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol*, **80**, 7569-7577.
- Nouri-Aria, K.T., Sallie, R., Mizokami, M., Portmann, B.C. and Williams, R. (1995) Intrahepatic expression of hepatitis C virus antigens in chronic liver disease. *J Pathol*, **175**, 77-83.
- Nydegger, S., Khurana, S., Kremontsov, D.N., Foti, M. and Thali, M. (2006) Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J Cell Biol*, **173**, 795-807.
- Odintsova, E., Butters, T.D., Monti, E., Sprong, H., van Meer, G. and Berditchevski, F. (2006) Gangliosides play an important role in the organization of CD82-enriched microdomains. *Biochem J*, **400**, 315-325.
- Odintsova, E., Sugiura, T. and Berditchevski, F. (2000) Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol*, **10**, 1009-1012.
- Odintsova, E., Voortman, J., Gilbert, E. and Berditchevski, F. (2003) Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *J Cell Sci*, **116**, 4557-4566.
- Okuda, M., Li, K., Beard, M.R., Showalter, L.A., Scholle, F., Lemon, S.M. and Weinman, S.A. (2002) Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*, **122**, 366-375.
- Olsen, D.B., Eldrup, A.B., Bartholomew, L., Bhat, B., Bosserman, M.R., Ceccacci, A., Colwell, L.F., Fay, J.F., Flores, O.A., Getty, K.L., Grobler, J.A., LaFemina, R.L., Markel, E.J., Migliaccio, G., Prhavic, M., Stahlhut, M.W., Tomassini, J.E., MacCoss, M., Hazuda, D.J. and Carroll, S.S. (2004) A 7-deaza-adenosine analog is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication with excellent pharmacokinetic properties. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 3944-3953.
- Ono, M., Handa, K., Sonnino, S., Withers, D.A., Nagai, H. and Hakomori, S. (2001) GM3 ganglioside inhibits CD9-facilitated haptotactic cell motility: coexpression of GM3 and CD9 is essential in the downregulation of tumor cell motility and malignancy. *Biochemistry*, **40**, 6414-6421.
- Op De Beeck, A., Montserret, R., Duvet, S., Cocquerel, L., Cacan, R., Barberot, B., Le Maire, M., Penin, F. and Dubuisson, J. (2000) The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *J Biol Chem*, **275**, 31428-31437.

- Op De Beeck, A., Voisset, C., Bartosch, B., Ciczora, Y., Cocquerel, L., Keck, Z., Fong, S., Cosset, F.L. and Dubuisson, J. (2004) Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol*, **78**, 2994-3002.
- Oren, R., Takahashi, S., Doss, C., Levy, R. and Levy, S. (1990) TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol*, **10**, 4007-4015.
- Orlicky, D.J. (1996) Negative regulatory activity of a prostaglandin F2 alpha receptor associated protein (FPRP). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **54**, 247-259.
- Orlicky, D.J., Lieber, J.G., Morin, C.L. and Evans, R.M. (1998) Synthesis and accumulation of a receptor regulatory protein associated with lipid droplet accumulation in 3T3-L1 cells. *J Lipid Res*, **39**, 1152-1161.
- Orlicky, D.J., Miller, G.J. and Evans, R.M. (1990) Identification and purification of a bovine corpora luteal membrane glycoprotein with [³H]prostaglandin F2-alpha binding properties. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **41**, 51-61.
- Orlicky, D.J. and Nordeen, S.K. (1996) Cloning, sequencing and proposed structure for a prostaglandin F2 alpha receptor regulatory protein. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **55**, 261-268.
- Otsuka, M., Kato, N., Lan, K., Yoshida, H., Kato, J., Goto, T., Shiratori, Y. and Omata, M. (2000) Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem*, **275**, 34122-34130.
- Owsianka, A., Clayton, R.F., Loomis-Price, L.D., McKeating, J.A. and Patel, A.H. (2001) Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *J Gen Virol*, **82**, 1877-1883.
- Owsianka, A.M., Timms, J.M., Tarr, A.W., Brown, R.J., Hickling, T.P., Szwejk, A., Bienkowska-Szewczyk, K., Thomson, B.J., Patel, A.H. and Ball, J.K. (2006) Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *J Virol*, **80**, 8695-8704.
- Pacheco, B., Gomez-Gutierrez, J., Yelamos, B., Delgado, C., Roncal, F., Albar, J.P., Peterson, D. and Gavilanes, F. (2006) Membrane-perturbing properties of three peptides corresponding to the ectodomain of hepatitis C virus E2 envelope protein. *Biochim Biophys Acta*, **1758**, 755-763.
- Pachiadakis, I., Pollara, G., Chain, B.M. and Naoumov, N.V. (2005) Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? *Lancet Infect Dis*, **5**, 296-304.
- Pal, S., Shuhart, M.C., Thomassen, L., Emerson, S.S., Su, T., Feuerborn, N., Kae, J. and Gretch, D.R. (2006) Intrahepatic hepatitis C virus replication correlates with chronic hepatitis C disease severity in vivo. *J Virol*, **80**, 2280-2290.
- Parfrey, H., Mahadeva, R. and Lomas, D.A. (2003) Alpha(1)-antitrypsin deficiency, liver disease and emphysema. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 1009-1014.
- Patel, A.H., Wood, J., Penin, F., Dubuisson, J. and McKeating, J.A. (2000) Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding. *J Gen Virol*, **81**, 2873-2883.
- Paton, N.I. and Aboulhab, J. (2005) Hydroxychloroquine, hydroxyurea and didanosine as initial therapy for HIV-infected patients with low viral load: safety, efficacy and resistance profile after 144 weeks. *HIV Med*, **6**, 13-20.
- Pavlovic, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B. and Zitzmann, N. (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6104-6108.
- Pawlotsky, J.M. (1999) Diagnostic tests for hepatitis C. *J Hepatol*, **31 Suppl 1**, 71-79.
- Pawlotsky, J.M. (2002) Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology*, **122**, 1554-1568.
- Pawlotsky, J.M. (2003) Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis*, **7**, 45-66.

- Pawlotsky, J.M., Chevaliez, S. and McHutchison, J.G. (2007) The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology*, **132**, 1979-1998.
- Payan, C., Roudot-Thoraval, F., Marcellin, P., Bled, N., Duverlie, G., Fouchard-Hubert, I., Trimoulet, P., Couzigou, P., Cointe, D., Chaput, C., Henquell, C., Abergel, A., Pawlotsky, J.M., Hezode, C., Coude, M., Bianchi, A., Alain, S., Loustaud-Ratti, V., Chevallier, P., Trepo, C., Gerolami, V., Portal, I., Halfon, P., Bourliere, M., Bogard, M., Plouvier, E., Laffont, C., Agius, G., Silvain, C., Brodard, V., Thieffin, G., Buffet-Janvresse, C., Riachi, G., Grattard, F., Bourlet, T., Stoll-Keller, F., Doffoel, M., Izopet, J., Barange, K., Martinot-Peignoux, M., Branger, M., Rosenberg, A., Sogni, P., Chaix, M.L., Pol, S., Thibault, V., Opolon, P., Charrois, A., Serfaty, L., Fouqueray, B., Grange, J.D., Lefrere, J.J. and Lunel-Fabiani, F. (2005) Changing of hepatitis C virus genotype patterns in France at the beginning of the third millenium: The GEMHEP GenoCII Study. *J Viral Hepat*, **12**, 405-413.
- Pecheur, E.I., Lavillette, D., Alcaras, F., Molle, J., Boriskin, Y.S., Roberts, M., Cosset, F.L. and Polyak, S.J. (2007) Biochemical mechanism of hepatitis C virus inhibition by the broad-spectrum antiviral arbidol. *Biochemistry*, **46**, 6050-6059.
- Pelchen-Matthews, A., Kramer, B. and Marsh, M. (2003) Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol*, **162**, 443-455.
- Pelkmans, L. and Helenius, A. (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic*, **3**, 311-320.
- Pelkmans, L. and Helenius, A. (2003) Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 414-422.
- Penha-Goncalves, C., Moule, C., Smink, L.J., Howson, J., Gregory, S., Rogers, J., Lyons, P.A., Suttie, J.J., Lord, C.J., Peterson, L.B., Todd, J.A. and Wicker, L.S. (2003) Identification of a structurally distinct CD101 molecule encoded in the 950-kb Idd10 region of NOD mice. *Diabetes*, **52**, 1551-1556.
- Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H.E., Bartenschlager, R. and Moradpour, D. (2004) Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem*, **279**, 40835-40843.
- Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P.O., Deleage, G. and Pawlotsky, J.M. (2001) Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol*, **75**, 5703-5710.
- Penna, A., Missale, G., Lamonaca, V., Pilli, M., Mori, C., Zanelli, P., Cavalli, A., Elia, G. and Ferrari, C. (2002) Intrahepatic and circulating HLA class II-restricted, hepatitis C virus-specific T cells: functional characterization in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, **35**, 1225-1236.
- Perez-Berna, A.J., Moreno, M.R., Guillen, J., Bernabeu, A. and Villalain, J. (2006) The membrane-active regions of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins. *Biochemistry*, **45**, 3755-3768.
- Pestka, J.M., Zeisel, M.B., Blaser, E., Schurmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., Rispeter, K., Blum, H.E., Roggendorf, M. and Baumert, T.F. (2007) Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 6025-6030.
- Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Fletcher, S.P., Jackson, R.J. and Hellen, C.U. (1998) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev*, **12**, 67-83.
- Petracca, R., Falugi, F., Galli, G., Norais, N., Rosa, D., Campagnoli, S., Burgio, V., Di Stasio, E., Giardina, B., Houghton, M., Abrignani, S. and Grandi, G. (2000) Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J Virol*, **74**, 4824-4830.
- Pflugheber, J., Fredericksen, B., Sumpter, R., Jr., Wang, C., Ware, F., Sodora, D.L. and Gale, M., Jr. (2002) Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4650-4655.

- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.L. and Bartenschlager, R. (2006) Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7408-7413.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D. and Bartenschlager, R. (2002) Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol*, **76**, 4008-4021.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. and Abrignani, S. (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, **282**, 938-941.
- Piodi, A., Chouteau, P., Lerat, H., Hezode, C. and Pawlotsky, J.M. (2008) Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis. *Hepatology*, **48**, 16-27.
- Pique, C., Lagaudriere-Gesbert, C., Delamarre, L., Rosenberg, A.R., Conjeaud, H. and Dokhelar, M.C. (2000) Interaction of CD82 tetraspanin proteins with HTLV-1 envelope glycoproteins inhibits cell-to-cell fusion and virus transmission. *Virology*, **276**, 455-465.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. and Tordo, N. (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J*, **8**, 3867-3874.
- Pohlmann, S., Soilleux, E.J., Baribaud, F., Leslie, G.J., Morris, L.S., Trowsdale, J., Lee, B., Coleman, N. and Doms, R.W. (2001) DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2670-2675.
- Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M. and McKeating, J.A. (2003) Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol*, **77**, 4070-4080.
- Poynard, T., Yuen, M.F., Ratziu, V. and Lai, C.L. (2003) Viral hepatitis C. *Lancet*, **362**, 2095-2100.
- Prabhu, R., Garry, R.F. and Dash, S. (2006) Small interfering RNA targeted to stem-loop II of the 5' untranslated region effectively inhibits expression of six HCV genotypes. *Virology*, **3**, 100.
- Pradel, G., Garapaty, S. and Frevert, U. (2002) Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol Microbiol*, **45**, 637-651.
- Premkumar, A., Wilson, L., Ewart, G.D. and Gage, P.W. (2004) Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett*, **557**, 99-103.
- Prince, A.M., Brotman, B., Grady, G.F., Kuhns, W.J., Hazzi, C., Levine, R.W. and Millian, S.J. (1974) Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet*, **2**, 241-246.
- Prince, A.M., Huima-Byron, T., Parker, T.S. and Levine, D.M. (1996) Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J Viral Hepat*, **3**, 11-17.
- Prince, A.M., Stephan, W., Dichtelmuller, H., Brotman, B. and Huima, T. (1985) Inactivation of the Hutchinson strain of non-A, non-B hepatitis virus by combined use of beta-propiolactone and ultraviolet irradiation. *J Med Virol*, **16**, 119-125.
- Qi, J.C., Wang, J., Mandadi, S., Tanaka, K., Roufogalis, B.D., Madigan, M.C., Lai, K., Yan, F., Chong, B.H., Stevens, R.L. and Krilis, S.A. (2006) Human and mouse mast cells use the tetraspanin CD9 as an alternate interleukin-16 receptor. *Blood*, **107**, 135-142.
- Racanelli, V. and Manigold, T. (2007) Presentation of HCV antigens to naive CD8+T cells: why the where, when, what and how are important for virus control and infection outcome. *Clin Immunol*, **124**, 5-12.
- Racanelli, V. and Rehermann, B. (2003) Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol*, **24**, 456-464.

- Radford, K.J., Mallesch, J. and Hersey, P. (1995) Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491). *Int J Cancer*, **62**, 631-635.
- Radford, K.J., Thorne, R.F. and Hersey, P. (1997) Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. *J Immunol*, **158**, 3353-3358.
- Raffaele, A., Valenti, M., Iovenitti, M., Matani, A., Bruno, M.L., Altobelli, E., D'Alessandro, A., Barnabei, R., Leonardis, B. and Taglieri, G. (2001) High prevalence of HCV infection among the general population in a rural area of central Italy. *Eur J Epidemiol*, **17**, 41-46.
- Rahner, C., Mitic, L.L. and Anderson, J.M. (2001) Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*, **120**, 411-422.
- Ralston, R., Thudium, K., Berger, K., Kuo, C., Gervase, B., Hall, J., Selby, M., Kuo, G., Houghton, M. and Choo, Q.L. (1993) Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol*, **67**, 6753-6761.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J. and Geuze, H.J. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, **183**, 1161-1172.
- Ray, P.S. and Das, S. (2004) Inhibition of hepatitis C virus IRES-mediated translation by small RNAs analogous to stem-loop structures of the 5'-untranslated region. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1678-1687.
- Ray, S.C., Fanning, L., Wang, X.H., Netski, D.M., Kenny-Walsh, E. and Thomas, D.L. (2005) Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. *J Exp Med*, **201**, 1753-1759.
- Reed, K.E. and Rice, C.M. (2000) Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol*, **242**, 55-84.
- Reesink, H.W., Zeuzem, S., Weegink, C.J., Forestier, N., van Vliet, A., van de Wetering de Rooij, J., McNair, L., Purdy, S., Kauffman, R., Alam, J. and Jansen, P.L. (2006) Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950: a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. *Gastroenterology*, **131**, 997-1002.
- Reyes, G.R. (2002) The nonstructural NS5A protein of hepatitis C virus: an expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis C virus pathogenesis. *J Biomed Sci*, **9**, 187-197.
- Reynolds, G.M., Harris, H.J., Jennings, A., Hu, K., Grove, J., Lalor, P.F., Adams, D.H., Balfe, P., Hubscher, S.G. and McKeating, J.A. (2008) Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology*, **47**, 418-427.
- Rhainds, D., Bourgeois, P., Bourret, G., Huard, K., Falstraalt, L. and Brissette, L. (2004) Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J Cell Sci*, **117**, 3095-3105.
- Rhainds, D. and Brissette, L. (2004) The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 39-77.
- Rivas, A., Ruegg, C.L., Zeitung, J., Laus, R., Warnke, R., Benike, C. and Engleman, E.G. (1995) V7, a novel leukocyte surface protein that participates in T cell activation. I. Tissue distribution and functional studies. *J Immunol*, **154**, 4423-4433.
- Roccasecca, R., Ansuini, H., Vitelli, A., Meola, A., Scarselli, E., Acali, S., Pezzanera, M., Ercole, B.B., McKeating, J., Yagnik, A., Lahm, A., Tramontano, A., Cortese, R. and Nicosia, A. (2003) Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol*, **77**, 1856-1867.
- Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., Drobecq, H., Le Naour, F., Charrin, S., Levy, S., Rubinstein, E., Dubuisson, J. and Cocquerel, L. (2008) The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE*, **3**, e1866.

- Roingeard, P., Hourieux, C., Blanchard, E., Brand, D. and Ait-Goughoulte, M. (2004) Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell*, **96**, 103-108.
- Romanelli, F., Smith, K.M. and Hoven, A.D. (2004) Chloroquine and hydroxychloroquine as inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV-1) activity. *Curr Pharm Des*, **10**, 2643-2648.
- Rosa, D., Saletti, G., De Gregorio, E., Zorat, F., Comar, C., D'Oro, U., Nuti, S., Houghton, M., Barnaba, V., Pozzato, G. and Abrignani, S. (2005) Activation of naive B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 18544-18549.
- Rouille, Y., Helle, F., Delgrange, D., Roingeard, P., Voisset, C., Blanchard, E., Belouzard, S., McKeating, J., Patel, A.H., Maertens, G., Wakita, T., Wychowski, C. and Dubuisson, J. (2006) Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol*, **80**, 2832-2841.
- Rous, B.A., Reaves, B.J., Ihrke, G., Briggs, J.A., Gray, S.R., Stephens, D.J., Banting, G. and Luzio, J.P. (2002) Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell*, **13**, 1071-1082.
- Roussel, J., Pillez, A., Montpellier, C., Duverlie, G., Cahour, A., Dubuisson, J. and Wychowski, C. (2003) Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *J Gen Virol*, **84**, 1751-1759.
- Roy, K., Hay, G., Andragetti, R., Taylor, A., Goldberg, D. and Wiessing, L. (2002) Monitoring hepatitis C virus infection among injecting drug users in the European Union: a review of the literature. *Epidemiol Infect*, **129**, 577-585.
- Rubbia-Brandt, L., Fabris, P., Paganin, S., Leandro, G., Male, P.J., Giostra, E., Carlotto, A., Bozzola, L., Smedile, A. and Negro, F. (2004) Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut*, **53**, 406-412.
- Rubbia-Brandt, L., Leandro, G., Spahr, L., Giostra, E., Quadri, R., Male, P.J. and Negro, F. (2001) Liver steatosis in chronic hepatitis C: a morphological sign suggesting infection with HCV genotype 3. *Histopathology*, **39**, 119-124.
- Rubbia-Brandt, L., Quadri, R., Abid, K., Giostra, E., Male, P.J., Mentha, G., Spahr, L., Zarski, J.P., Borisch, B., Hadengue, A. and Negro, F. (2000) Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol*, **33**, 106-115.
- Rubinstein, E., Billard, M., Plaisance, S., Prenant, M. and Boucheix, C. (1993) Molecular cloning of the mouse equivalent of CD9 antigen. *Thromb Res*, **71**, 377-383.
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Billard, M., Prenant, M. and Boucheix, C. (1994) CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes. *Eur J Immunol*, **24**, 3005-3013.
- Rubinstein, E., Le Naour, F., Lagaudriere-Gesbert, C., Billard, M., Conjeaud, H. and Boucheix, C. (1996) CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol*, **26**, 2657-2665.
- Rubinstein, E., Poindessous-Jazat, V., Le Naour, F., Billard, M. and Boucheix, C. (1997) CD9, but not other tetraspans, associates with the beta1 integrin precursor. *Eur J Immunol*, **27**, 1919-1927.
- Rubinstein, E., Ziyat, A., Prenant, M., Wrobel, E., Wolf, J.P., Levy, S., Le Naour, F. and Boucheix, C. (2006) Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Dev Biol*, **290**, 351-358.
- Rudd, P.M. and Dwek, R.A. (1997) Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **32**, 1-100.
- Ruegg, C.L., Rivas, A., Madani, N.D., Zeitung, J., Laus, R. and Engleman, E.G. (1995) V7, a novel leukocyte surface protein that participates in T cell activation. II. Molecular cloning and characterization of the V7 gene. *J Immunol*, **154**, 4434-4443.
- Ruiz-Mateos, E., Pelchen-Matthews, A., Deneka, M. and Marsh, M. (2008) CD63 is not Required for the Production of Infectious Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Human Macrophages. *J Virol*.
- Rumin, S., Berthillon, P., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Trabaud, M.A., Bizollon, T., Gouillat, C., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., Inchauspe, G. and Trepo, C. (1999) Dynamic

- analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol*, **80** (Pt 11), 3007-3018.
- Runge, K.E., Evans, J.E., He, Z.Y., Gupta, S., McDonald, K.L., Stahlberg, H., Primakoff, P. and Myles, D.G. (2007) Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev Biol*, **304**, 317-325.
- Russ, W.P. and Engelman, D.M. (2000) The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol*, **296**, 911-919.
- Saadoun, D., Landau, D.A., Calabrese, L.H. and Cacoub, P.P. (2007) Hepatitis C-associated mixed cryoglobulinaemia: a crossroad between autoimmunity and lymphoproliferation. *Rheumatology (Oxford)*, **46**, 1234-1242.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H. and Bukh, J. (2003) The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 11646-11651.
- Sala-Valdes, M., Ursa, A., Charrin, S., Rubinstein, E., Hemler, M.E., Sanchez-Madrid, F. and Yanez-Mo, M. (2006) EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J Biol Chem*, **281**, 19665-19675.
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Negre, D., Le Grand, R., Trono, D. and Cosset, F.L. (2002) Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood*, **100**, 823-832.
- Sansonno, D., Carbone, A., De Re, V. and Dammacco, F. (2007) Hepatitis C virus infection, cryoglobulinaemia, and beyond. *Rheumatology (Oxford)*, **46**, 572-578.
- Santolini, E., Migliaccio, G. and La Monica, N. (1994) Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol*, **68**, 3631-3641.
- Sarnow, P. (2003) Viral internal ribosome entry site elements: novel ribosome-RNA complexes and roles in viral pathogenesis. *J Virol*, **77**, 2801-2806.
- Sarrazin, C., Kieffer, T.L., Bartels, D., Hanzelka, B., Muh, U., Welker, M., Wincheringer, D., Zhou, Y., Chu, H.M., Lin, C., Weegink, C., Reesink, H., Zeuzem, S. and Kwong, A.D. (2007a) Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology*, **132**, 1767-1777.
- Sarrazin, C., Rouzier, R., Wagner, F., Forestier, N., Larrey, D., Gupta, S.K., Hussain, M., Shah, A., Cutler, D., Zhang, J. and Zeuzem, S. (2007b) SCH 503034, a novel hepatitis C virus protease inhibitor, plus pegylated interferon alpha-2b for genotype 1 nonresponders. *Gastroenterology*, **132**, 1270-1278.
- Sato, K., Aoki, J., Misawa, N., Daikoku, E., Sano, K., Tanaka, Y. and Koyanagi, Y. (2008) Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol*, **82**, 1021-1033.
- Sato, Y., Kato, J., Takimoto, R., Takada, K., Kawano, Y., Miyanishi, K., Kobune, M., Sato, Y., Takayama, T., Matunaga, T. and Niitsu, Y. (2006) Hepatitis C virus core protein promotes proliferation of human hepatoma cells through enhancement of transforming growth factor alpha expression via activation of nuclear factor-kappaB. *Gut*, **55**, 1801-1808.
- Saunier, B., Triyatni, M., Ulianich, L., Maruvada, P., Yen, P. and Kohn, L.D. (2003) Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol*, **77**, 546-559.
- Saupe, S., Roizes, G., Peter, M., Boyle, S., Gardiner, K. and De Sario, A. (1998) Molecular cloning of a human cDNA IGSF3 encoding an immunoglobulin-like membrane protein: expression and mapping to chromosome band 1p13. *Genomics*, **52**, 305-311.
- Sawada, S., Yoshimoto, M., Odintsova, E., Hotchin, N.A. and Berditchevski, F. (2003) The tetraspanin CD151 functions as a negative regulator in the adhesion-dependent activation of Ras. *J Biol Chem*, **278**, 26323-26326.

- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. and Vitelli, A. (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J*, **21**, 5017-5025.
- Schiavon, V., Roth, P., Bolton, W.E., Farcet, J.P., Bensussan, A. and Boumsell, L. (1996) Lymphocytes subsets in normal individuals: analysis by four color immunofluorescence and flow cytometry on whole blood. *Tissue Antigens*, **48**, 312-318.
- Schick, M.R. and Levy, S. (1993) The TAPA-1 molecule is associated on the surface of B cells with HLA-DR molecules. *J Immunol*, **151**, 4090-4097.
- Schirren, C.A., Jung, M.C., Gerlach, J.T., Worzfeld, T., Baretton, G., Mamin, M., Hubert Gruener, N., Houghton, M. and Pape, G.R. (2000) Liver-derived hepatitis C virus (HCV)-specific CD4(+) T cells recognize multiple HCV epitopes and produce interferon gamma. *Hepatology*, **32**, 597-603.
- Schmid, E., Zurbriggen, A., Gassen, U., Rima, B., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (2000) Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibit canine distemper virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion. *J Virol*, **74**, 7554-7561.
- Schmidt-Mende, J., Bieck, E., Hugle, T., Penin, F., Rice, C.M., Blum, H.E. and Moradpour, D. (2001) Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem*, **276**, 44052-44063.
- Schmidt, C., Kunemund, V., Wintergerst, E.S., Schmitz, B. and Schachner, M. (1996) CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J Neurosci Res*, **43**, 12-31.
- Schneeberger, E.E. and Lynch, R.D. (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, **286**, C1213-1228.
- Schneider-Schaulies, J. (2000) Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J Gen Virol*, **81**, 1413-1429.
- Scholle, F., Li, K., Bodola, F., Ikeda, M., Luxon, B.A. and Lemon, S.M. (2004) Virus-host cell interactions during hepatitis C virus RNA replication: impact of polyprotein expression on the cellular transcriptome and cell cycle association with viral RNA synthesis. *J Virol*, **78**, 1513-1524.
- Schulze zur Wiesch, J., Lauer, G.M., Day, C.L., Kim, A.Y., Ouchi, K., Duncan, J.E., Wurcel, A.G., Timm, J., Jones, A.M., Mothe, B., Allen, T.M., McGovern, B., Lewis-Ximenez, L., Sidney, J., Sette, A., Chung, R.T. and Walker, B.D. (2005) Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol*, **175**, 3603-3613.
- Schwartz-Albiez, R., Dorken, B., Hofmann, W. and Moldenhauer, G. (1988) The B cell-associated CD37 antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein. *J Immunol*, **140**, 905-914.
- Seeger, C. (2005) Salient molecular features of hepatitis C virus revealed. *Trends Microbiol*, **13**, 528-534.
- Seehafer, J.G., Tang, S.C., Slupsky, J.R. and Shaw, A.R. (1988) The functional glycoprotein CD9 is variably acylated: localization of the variably acylated region to a membrane-associated peptide containing the binding site for the agonistic monoclonal antibody 50H.19. *Biochim Biophys Acta*, **957**, 399-410.
- Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S. and Chretien, M. (1991) Mammalian neural and endocrine pro-protein and pro-hormone convertases belonging to the subtilisin family of serine proteinases. *Enzyme*, **45**, 271-284.
- Seigneuret, M. (2006) Complete predicted three-dimensional structure of the facilitator transmembrane protein and hepatitis C virus receptor CD81: conserved and variable structural domains in the tetraspanin superfamily. *Biophys J*, **90**, 212-227.
- Seigneuret, M., Delaguillamie, A., Lagaudriere-Gesbert, C. and Conjeaud, H. (2001) Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem*, **276**, 40055-40064.

- Seong, Y.R., Lee, C.H. and Im, D.S. (1998) Characterization of the structural proteins of hepatitis C virus expressed by an adenovirus recombinant. *Virus Res*, **55**, 177-185.
- Serebrov, V. and Pyle, A.M. (2004) Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature*, **430**, 476-480.
- Serru, V., Le Naour, F., Billard, M., Azorsa, D.O., Lanza, F., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (1999) Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem J*, **340 (Pt 1)**, 103-111.
- Sharma, C., Yang, X.H. and Hemler, M.E. (2008) DHHC2 Affects Palmitoylation, Stability, and Functions of Tetraspanins CD9 and CD151. *Mol Biol Cell*.
- Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., McLauchlan, J. and Bartenschlager, R. (2007) The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem*, **282**, 37158-37169.
- Shaw, A.R., Domanska, A., Mak, A., Gilchrist, A., Dobler, K., Visser, L., Poppema, S., Fliegel, L., Letarte, M. and Willett, B.J. (1995) Ectopic expression of human and feline CD9 in a human B cell line confers beta 1 integrin-dependent motility on fibronectin and laminin substrates and enhanced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, **270**, 24092-24099.
- Shaw, M.L., McLauchlan, J., Mills, P.R., Patel, A.H. and McCrudden, E.A. (2003) Characterisation of the differences between hepatitis C virus genotype 3 and 1 glycoproteins. *J Med Virol*, **70**, 361-372.
- Shi, W., Fan, H., Shum, L. and Derynck, R. (2000) The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF-alpha and regulates TGF-alpha-induced EGF receptor activation and cell proliferation. *J Cell Biol*, **148**, 591-602.
- Shimizu, Y.K., Igarashi, H., Kiyohara, T., Cabezon, T., Farci, P., Purcell, R.H. and Yoshikura, H. (1996) A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology*, **223**, 409-412.
- Shimizu, Y.K., Igarashi, H., Kiyohara, T., Shapiro, M., Wong, D.C., Purcell, R.H. and Yoshikura, H. (1998) Infection of a chimpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture. *J Gen Virol*, **79 (Pt 6)**, 1383-1386.
- Shimizu, Y.K., Iwamoto, A., Hijikata, M., Purcell, R.H. and Yoshikura, H. (1992) Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5477-5481.
- Shimoike, T., Mimori, S., Tani, H., Matsuura, Y. and Miyamura, T. (1999) Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol*, **73**, 9718-9725.
- Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K. and Murakami, S. (2002) Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem*, **277**, 11149-11155.
- Shoham, T., Rajapaksa, R., Boucheix, C., Rubinstein, E., Poe, J.C., Tedder, T.F. and Levy, S. (2003) The tetraspanin CD81 regulates the expression of CD19 during B cell development in a postendoplasmic reticulum compartment. *J Immunol*, **171**, 4062-4072.
- Shoham, T., Rajapaksa, R., Kuo, C.C., Haimovich, J. and Levy, S. (2006) Building of the tetraspanin web: distinct structural domains of CD81 function in different cellular compartments. *Mol Cell Biol*, **26**, 1373-1385.
- Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghayeb, J., Reimann, K.A. and Walker, C.M. (2003) Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med*, **197**, 1645-1655.
- Shoukry, N.H., Sidney, J., Sette, A. and Walker, C.M. (2004) Conserved hierarchy of helper T cell responses in a chimpanzee during primary and secondary hepatitis C virus infections. *J Immunol*, **172**, 483-492.

- Sillanpaa, M., Kaukinen, P., Melen, K. and Julkunen, I. (2008) Hepatitis C virus proteins interfere with the activation of chemokine gene promoters and downregulate chemokine gene expression. *J Gen Virol*, **89**, 432-443.
- Silvie, O., Charrin, S., Billard, M., Franetich, J.F., Clark, K.L., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., Dautry, F., Boucheix, C., Mazier, D. and Rubinstein, E. (2006a) Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *J Cell Sci*, **119**, 1992-2002.
- Silvie, O., Franetich, J.F., Boucheix, C., Rubinstein, E. and Mazier, D. (2007) Alternative invasion pathways for *Plasmodium berghei* sporozoites. *Int J Parasitol*, **37**, 173-182.
- Silvie, O., Greco, C., Franetich, J.F., Dubart-Kupperschmitt, A., Hannoun, L., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., Levy, S., Boucheix, C., Rubinstein, E. and Mazier, D. (2006b) Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the *Plasmodium* species. *Cell Microbiol*, **8**, 1134-1146.
- Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J.F., Prenant, M., Belnoue, E., Renia, L., Hannoun, L., Eling, W., Levy, S., Boucheix, C. and Mazier, D. (2003) Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat Med*, **9**, 93-96.
- Simmonds, P. (1995) Variability of hepatitis C virus. *Hepatology*, **21**, 570-583.
- Simmonds, P. (2004) Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol*, **85**, 3173-3188.
- Simmonds, P., Holmes, E.C., Cha, T.A., Chan, S.W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P.L., Kolberg, J. and Urdea, M.S. (1993) Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*, **74 (Pt 11)**, 2391-2399.
- Sincock, P.M., Fitter, S., Parton, R.G., Berndt, M.C., Gamble, J.R. and Ashman, L.K. (1999) PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. *J Cell Sci*, **112 (Pt 6)**, 833-844.
- Singethan, K., Muller, N., Schubert, S., Luttge, D., Kremmentsov, D.N., Khurana, S.R., Krohne, G., Schneider-Schaulies, S., Thali, M. and Schneider-Schaulies, J. (2008) CD9 Clustering and Formation of Microvilli Zippers Between Contacting Cells Regulates Virus-Induced Cell Fusion. *Traffic*.
- Siridechadilok, B., Fraser, C.S., Hall, R.J., Doudna, J.A. and Nogales, E. (2005) Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science*, **310**, 1513-1515.
- Slupsky, J.R., Seehafer, J.G., Tang, S.C., Masellis-Smith, A. and Shaw, A.R. (1989) Evidence that monoclonal antibodies against CD9 antigen induce specific association between CD9 and the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem*, **264**, 12289-12293.
- Smeekens, S.P. (1993) Processing of protein precursors by a novel family of subtilisin-related mammalian endoproteases. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 182-186.
- Smith, D.B., Pathirana, S., Davidson, F., Lawlor, E., Power, J., Yap, P.L. and Simmonds, P. (1997) The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol*, **78 (Pt 2)**, 321-328.
- Smith, D.B. and Simmonds, P. (1997) Review: molecular epidemiology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol Hepatol*, **12**, 522-527.
- Soares, L.R., Rivas, A., Ruegg, C. and Engleman, E.G. (1997a) Differential response of CD4+ V7+ and CD4+ V7- T cells to T cell receptor-dependent signals: CD4+ V7+ T cells are co-stimulation independent and anti-V7 antibody blocks the induction of anergy by bacterial superantigen. *Eur J Immunol*, **27**, 1413-1421.
- Soares, L.R., Rivas, A., Tsavaler, L. and Engleman, E.G. (1997b) Ligation of the V7 molecule on T cells blocks anergy induction through a CD28-independent mechanism. *J Immunol*, **159**, 1115-1124.
- Soares, L.R., Tsavaler, L., Rivas, A. and Engleman, E.G. (1998) V7 (CD101) ligation inhibits TCR/CD3-induced IL-2 production by blocking Ca²⁺ flux and nuclear factor of activated T cell nuclear translocation. *J Immunol*, **161**, 209-217.

- Soilleux, E.J., Morris, L.S., Leslie, G., Chehimi, J., Luo, Q., Levroney, E., Trowsdale, J., Montaner, L.J., Doms, R.W., Weissman, D., Coleman, N. and Lee, B. (2002) Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol*, **71**, 445-457.
- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Junemann, C., Bartenschlager, R. and Niepmann, M. (2006) The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol*, **80**, 11579-11588.
- Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., Yonemura, S., Katahira, J., Horiguchi, Y. and Tsukita, S. (1999) Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol*, **147**, 195-204.
- Spangenberg, H.C., Viazov, S., Kersting, N., Neumann-Haefelin, C., McKinney, D., Roggendorf, M., von Weizsacker, F., Blum, H.E. and Thimme, R. (2005) Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, **42**, 828-837.
- Sperber, K., Louie, M., Kraus, T., Proner, J., Sapira, E., Lin, S., Stecher, V. and Mayer, L. (1995) Hydroxychloroquine treatment of patients with human immunodeficiency virus type 1. *Clin Ther*, **17**, 622-636.
- Steiner, D.F., Smeekens, S.P., Ohagi, S. and Chan, S.J. (1992) The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J Biol Chem*, **267**, 23435-23438.
- Steinkuhler, C., Biasiol, G., Brunetti, M., Urbani, A., Koch, U., Cortese, R., Pessi, A. and De Francesco, R. (1998) Product inhibition of the hepatitis C virus NS3 protease. *Biochemistry*, **37**, 8899-8905.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R. and Pietschmann, T. (2007) Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog*, **3**, e103.
- Stipp, C.S. and Hemler, M.E. (2000) Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associate with alpha 3 beta 1 integrin, and selectively contribute to alpha 3 beta 1-dependent neurite outgrowth. *J Cell Sci*, **113 (Pt 11)**, 1871-1882.
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V. and Hemler, M.E. (2001a) EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem*, **276**, 40545-40554.
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V. and Hemler, M.E. (2003a) EWI-2 regulates alpha3beta1 integrin-dependent cell functions on laminin-5. *J Cell Biol*, **163**, 1167-1177.
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V. and Hemler, M.E. (2003b) Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci*, **28**, 106-112.
- Stipp, C.S., Orlicky, D. and Hemler, M.E. (2001b) FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9-associated protein. *J Biol Chem*, **276**, 4853-4862.
- Stockert, R.J. (1995) The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev*, **75**, 591-609.
- Sun, B.S., Pan, J., Clayton, M.M., Liu, J., Yan, X., Matskevich, A.A., Strayer, D.S., Gerber, M. and Feitelson, M.A. (2004) Hepatitis C virus replication in stably transfected HepG2 cells promotes hepatocellular growth and tumorigenesis. *J Cell Physiol*, **201**, 447-458.
- Sung, V.M., Shimodaira, S., Doughty, A.L., Picchio, G.R., Can, H., Yen, T.S., Lindsay, K.L., Levine, A.M. and Lai, M.M. (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. *J Virol*, **77**, 2134-2146.
- Tabor, E., Gerety, R.J., Drucker, J.A., Seeff, L.B., Hoofnagle, J.H., Jackson, D.R., April, M., Barker, L.F. and Pineda-Tamondong, G. (1978) Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet*, **1**, 463-466.
- Tachibana, I., Bodorova, J., Berditchevski, F., Zutter, M.M. and Hemler, M.E. (1997) NAG-2, a novel transmembrane-4 superfamily (TM4SF) protein that complexes with integrins and other TM4SF proteins. *J Biol Chem*, **272**, 29181-29189.

- Tachibana, I. and Hemler, M.E. (1999) Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J Cell Biol*, **146**, 893-904.
- Tai, C.L., Chi, W.K., Chen, D.S. and Hwang, L.H. (1996) The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol*, **70**, 8477-8484.
- Takahashi, M., Sugiura, T., Abe, M., Ishii, K. and Shirasuna, K. (2007) Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin KAI-1/CD82 affects cancer cell migration. *Int J Cancer*, **121**, 1919-1929.
- Takahashi, Y., Bigler, D., Ito, Y. and White, J.M. (2001) Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol Biol Cell*, **12**, 809-820.
- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., Miller, J.L., Manns, M.P. and Rehermann, B. (2000) Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med*, **6**, 578-582.
- Takeda, Y., Kazarov, A.R., Butterfield, C.E., Hopkins, B.D., Benjamin, L.E., Kaipainen, A. and Hemler, M.E. (2007) Deletion of tetraspanin Cd151 results in decreased pathologic angiogenesis in vivo and in vitro. *Blood*, **109**, 1524-1532.
- Takeda, Y., Tachibana, I., Miyado, K., Kobayashi, M., Miyazaki, T., Funakoshi, T., Kimura, H., Yamane, H., Saito, Y., Goto, H., Yoneda, T., Yoshida, M., Kumagai, T., Osaki, T., Hayashi, S., Kawase, I. and Mekada, E. (2003) Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *J Cell Biol*, **161**, 945-956.
- Tan, S.L. and Katze, M.G. (2001) How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology*, **284**, 1-12.
- Tanigawa, M., Miyamoto, K., Kobayashi, S., Sato, M., Akutsu, H., Okabe, M., Mekada, E., Sakakibara, K., Miyado, M., Umezawa, A. and Miyado, K. (2008) Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Mol Reprod Dev*, **75**, 150-155.
- Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S. and Shimotohno, K. (1995) Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J Virol*, **69**, 3980-3986.
- Tardif, M.R. and Tremblay, M.J. (2005) Tetraspanin CD81 provides a costimulatory signal resulting in increased human immunodeficiency virus type 1 gene expression in primary CD4+ T lymphocytes through NF-kappaB, NFAT, and AP-1 transduction pathways. *J Virol*, **79**, 4316-4328.
- Targett-Adams, P., Hope, G., Boulant, S. and McLauchlan, J. (2008) Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem*.
- Tarrant, J.M., Groom, J., Metcalf, D., Li, R., Borobokas, B., Wright, M.D., Tarlinton, D. and Robb, L. (2002) The absence of Tssc6, a member of the tetraspanin superfamily, does not affect lymphoid development but enhances in vitro T-cell proliferative responses. *Mol Cell Biol*, **22**, 5006-5018.
- Taylor, N.A., Van De Ven, W.J. and Creemers, J.W. (2003) Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *Faseb J*, **17**, 1215-1227.
- Tedder, T.F., Zhou, L.J. and Engel, P. (1994) The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today*, **15**, 437-442.
- Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L. and Treadaway, J. (2008) Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog*, **4**, e1000032.
- Tellinghuisen, T.L. and Rice, C.M. (2002) Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 419-427.
- Tester, I., Smyk-Pearson, S., Wang, P., Wertheimer, A., Yao, E., Lewinsohn, D.M., Tavis, J.E. and Rosen, H.R. (2005) Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J Exp Med*, **201**, 1725-1731.
- Thery, C., Zitvogel, L. and Amigorena, S. (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, **2**, 569-579.

- Thiers, V., Jaffredo, F., Tuveri, R., Chodan, N. and Brechot, C. (1997) Development of a simple restriction fragment length polymorphism (RFLP) based assay for HCV genotyping and comparative analysis with genotyping and serotyping tests. *J Virol Methods*, **65**, 9-17.
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H.C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R.H. and Chisari, F.V. (2002) Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15661-15668.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.M., Steiger, C., Ray, S.C. and Chisari, F.V. (2001) Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med*, **194**, 1395-1406.
- Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 753-766.
- Timm, J., Lauer, G.M., Kavanagh, D.G., Sheridan, I., Kim, A.Y., Lucas, M., Pillay, T., Ouchi, K., Reyor, L.L., Schulze zur Wiesch, J., Gandhi, R.T., Chung, R.T., Bhardwaj, N., Klenerman, P., Walker, B.D. and Allen, T.M. (2004) CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med*, **200**, 1593-1604.
- Tokuhara, T., Hasegawa, H., Hattori, N., Ishida, H., Taki, T., Tachibana, S., Sasaki, S. and Miyake, M. (2001) Clinical significance of CD151 gene expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, **7**, 4109-4114.
- Tomei, L., Altamura, S., Bartholomew, L., Bisbocci, M., Bailey, C., Bosserman, M., Cellucci, A., Forte, E., Incitti, I., Orsatti, L., Koch, U., De Francesco, R., Olsen, D.B., Carroll, S.S. and Migliaccio, G. (2004) Characterization of the inhibition of hepatitis C virus RNA replication by nonnucleosides. *J Virol*, **78**, 938-946.
- Tomlinson, M.G. and Wright, M.D. (1996) Characterisation of mouse CD37: cDNA and genomic cloning. *Mol Immunol*, **33**, 867-872.
- Toyo-oka, K., Yashiro-Ohtani, Y., Park, C.S., Tai, X.G., Miyake, K., Hamaoka, T. and Fujiwara, H. (1999) Association of a tetraspanin CD9 with CD5 on the T cell surface: role of particular transmembrane domains in the association. *Int Immunol*, **11**, 2043-2052.
- Troesch, M., Meunier, I., Lapierre, P., Lapointe, N., Alvarez, F., Boucher, M. and Soudeyans, H. (2006) Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology*, **352**, 357-367.
- Tscherne, D.M., Jones, C.T., Evans, M.J., Lindenbach, B.D., McKeating, J.A. and Rice, C.M. (2006) Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol*, **80**, 1734-1741.
- Tseng, C.T. and Klimpel, G.R. (2002) Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med*, **195**, 43-49.
- Tsitsikov, E.N., Gutierrez-Ramos, J.C. and Geha, R.S. (1997) Impaired CD19 expression and signaling, enhanced antibody response to type II T independent antigen and reduction of B-1 cells in CD81-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10844-10849.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. and Nomoto, A. (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*, **66**, 1476-1483.
- Tu, L., Sun, T.T. and Kreibich, G. (2002) Specific heterodimer formation is a prerequisite for uroplakins to exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **13**, 4221-4230.
- Uhlir, C.M. and Whitehead, A.S. (1999) Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem*, **265**, 501-523.
- Urbani, S., Amadei, B., Fiscaro, P., Pilli, M., Missale, G., Bertolotti, A. and Ferrari, C. (2005) Heterologous T cell immunity in severe hepatitis C virus infection. *J Exp Med*, **201**, 675-680.
- Valiante, N.M., D'Andrea, A., Crotta, S., Lechner, F., Klenerman, P., Nuti, S., Wack, A. and Abrignani, S. (2000) Life, activation and death of intrahepatic lymphocytes in chronic hepatitis C. *Immunol Rev*, **174**, 77-89.

- Van Itallie, C.M. and Anderson, J.M. (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*, **68**, 403-429.
- van Sriel, A.B., Puls, K.L., Sofi, M., Pouniotis, D., Hochrein, H., Orinska, Z., Knobloch, K.P., Plebanski, M. and Wright, M.D. (2004) A regulatory role for CD37 in T cell proliferation. *J Immunol*, **172**, 2953-2961.
- VanCompernelle, S.E., Wiznycia, A.V., Rush, J.R., Dhanasekaran, M., Baures, P.W. and Todd, S.C. (2003) Small molecule inhibition of hepatitis C virus E2 binding to CD81. *Virology*, **314**, 371-380.
- Varaklioti, A., Vassilaki, N., Georgopoulou, U. and Mavromara, P. (2002) Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem*, **277**, 17713-17721.
- Vassilaki, N., Boleti, H. and Mavromara, P. (2008) Expression studies of the HCV-1a core+1 open reading frame in mammalian cells. *Virus Res*, **133**, 123-135.
- Vassilaki, N. and Mavromara, P. (2003) Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem*, **278**, 40503-40513.
- Vidal-Laliena, M., Romero, X., March, S., Requena, V., Petriz, J. and Engel, P. (2005) Characterization of antibodies submitted to the B cell section of the 8th Human Leukocyte Differentiation Antigens Workshop by flow cytometry and immunohistochemistry. *Cell Immunol*, **236**, 6-16.
- Vigerust, D.J. and Shepherd, V.L. (2007) Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol*, **15**, 211-218.
- Villanueva, R.A., Rouille, Y. and Dubuisson, J. (2005) Interactions between virus proteins and host cell membranes during the viral life cycle. *Int Rev Cytol*, **245**, 171-244.
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J. and Vu-Dac, N. (2005) High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem*, **280**, 7793-7799.
- Voisset, C., Lavie, M., Helle, F., De Beeck, A.O., Bilheu, A., Bertrand-Michel, J., Terce, F., Cocquerel, L., Wychowski, C., Vu-Dac, N. and Dubuisson, J. (2007) Ceramide enrichment of the plasma membrane induces CD81 internalization and inhibits hepatitis C virus entry. *Cell Microbiol*.
- Voisset, C., Lavie, M., Helle, F., Op De Beeck, A., Bilheu, A., Bertrand-Michel, J., Terce, F., Cocquerel, L., Wychowski, C., Vu-Dac, N. and Dubuisson, J. (2008) Ceramide enrichment of the plasma membrane induces CD81 internalization and inhibits hepatitis C virus entry. *Cell Microbiol*, **10**, 606-617.
- Voisset, C., Op de Beeck, A., Horellou, P., Dreux, M., Gustot, T., Duverlie, G., Cosset, F.L., Vu-Dac, N. and Dubuisson, J. (2006) High-density lipoproteins reduce the neutralizing effect of hepatitis C virus (HCV)-infected patient antibodies by promoting HCV entry. *J Gen Virol*, **87**, 2577-2581.
- von Hahn, T., Lindenbach, B.D., Boullier, A., Quehenberger, O., Paulson, M., Rice, C.M. and McKeating, J.A. (2006) Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology*, **43**, 932-942.
- von Lindern, J.J., Rojo, D., Grovit-Ferbas, K., Yeramian, C., Deng, C., Herbein, G., Ferguson, M.R., Pappas, T.C., Decker, J.M., Singh, A., Collman, R.G. and O'Brien, W.A. (2003) Potential role for CD63 in CCR5-mediated human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *J Virol*, **77**, 3624-3633.
- Vrolijk, J.M., Kwekkeboom, J., Janssen, H.L., Hansen, B.E., Zondervan, P.E., Osterhaus, A.D., Schalm, S.W. and Haagmans, B.L. (2003) Pretreatment intrahepatic CD8+ cell count correlates with virological response to antiviral therapy in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*, **188**, 1528-1532.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. and Liang, T.J. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*.

- Walewski, J.L., Keller, T.R., Stump, D.D. and Branch, A.D. (2001) Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *Rna*, **7**, 710-721.
- Walters, R.W., Freimuth, P., Moninger, T.O., Ganske, I., Zabner, J. and Welsh, M.J. (2002) Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell*, **110**, 789-799.
- Watashi, K. and Shimotohno, K. (2003) The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: a novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. *Cancer Sci*, **94**, 937-943.
- Waterhouse, R., Ha, C. and Dveksler, G.S. (2002) Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *J Exp Med*, **195**, 277-282.
- Waxman, L., Whitney, M., Pollok, B.A., Kuo, L.C. and Darke, P.L. (2001) Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13931-13935.
- Wedemeyer, H., He, X.S., Nascimbeni, M., Davis, A.R., Greenberg, H.B., Hoofnagle, J.H., Liang, T.J., Alter, H. and Rehermann, B. (2002) Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*, **169**, 3447-3458.
- Weiner, A.J., Brauer, M.J., Rosenblatt, J., Richman, K.H., Tung, J., Crawford, K., Bonino, F., Saracco, G., Choo, Q.L., Houghton, M. and et al. (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**, 842-848.
- Westin, J., Nordlinder, H., Lagging, M., Norkrans, G. and Wejstal, R. (2002) Steatosis accelerates fibrosis development over time in hepatitis C virus genotype 3 infected patients. *J Hepatol*, **37**, 837-842.
- Willett, B., Hosie, M., Shaw, A. and Neil, J. (1997) Inhibition of feline immunodeficiency virus infection by CD9 antibody operates after virus entry and is independent of virus tropism. *J Gen Virol*, **78 (Pt 3)**, 611-618.
- Willett, B.J., Hosie, M.J., Jarrett, O. and Neil, J.C. (1994) Identification of a putative cellular receptor for feline immunodeficiency virus as the feline homologue of CD9. *Immunology*, **81**, 228-233.
- Winterwood, N.E., Varzavand, A., Meland, M.N., Ashman, L.K. and Stipp, C.S. (2006) A critical role for tetraspanin CD151 in alpha3beta1 and alpha6beta4 integrin-dependent tumor cell functions on laminin-5. *Mol Biol Cell*, **17**, 2707-2721.
- Witherden, D.A., Boismenu, R. and Havran, W.L. (2000) CD81 and CD28 costimulate T cells through distinct pathways. *J Immunol*, **165**, 1902-1909.
- Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H.G., Dammaco, F., Rice, C.M., Blum, H.E. and Moradpour, D. (2000) Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol*, **74**, 2293-2304.
- Wong, D.K., Dudley, D.D., Afdhal, N.H., Dienstag, J., Rice, C.M., Wang, L., Houghton, M., Walker, B.D. and Koziel, M.J. (1998) Liver-derived CTL in hepatitis C virus infection: breadth and specificity of responses in a cohort of persons with chronic infection. *J Immunol*, **160**, 1479-1488.
- Wong, D.K., Dudley, D.D., Dohrenwend, P.B., Lauer, G.M., Chung, R.T., Thomas, D.L. and Walker, B.D. (2001) Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV. *J Virol*, **75**, 1229-1235.
- Wright, M.D., Moseley, G.W. and van Sriel, A.B. (2004) Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease. *Tissue Antigens*, **64**, 533-542.
- Wright, M.D., Rochelle, J.M., Tomlinson, M.G., Seldin, M.F. and Williams, A.F. (1993) Gene structure, chromosomal localization, and protein sequence of mouse CD53 (Cd53): evidence that the transmembrane 4 superfamily arose by gene duplication. *Int Immunol*, **5**, 209-216.
- Wu, S.F., Lee, C.J., Liao, C.L., Dwek, R.A., Zitzmann, N. and Lin, Y.L. (2002) Antiviral effects of an iminosugar derivative on flavivirus infections. *J Virol*, **76**, 3596-3604.

- Wunschmann, S., Medh, J.D., Klinzmann, D., Schmidt, W.N. and Stapleton, J.T. (2000) Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol*, **74**, 10055-10062.
- Wunschmann, S., Muller, H.M., Stipp, C.S., Hemler, M.E. and Stapleton, J.T. (2006) In vitro interaction between hepatitis C virus (HCV) envelope glycoprotein E2 and serum lipoproteins (LPs) results in enhanced cellular binding of both HCV E2 and LPs. *J Infect Dis*, **194**, 1058-1067.
- Xie, Z.C., Riezu-Boj, J.I., Lasarte, J.J., Guillen, J., Su, J.H., Civeira, M.P. and Prieto, J. (1998) Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology*, **244**, 513-520.
- Xu, Z., Choi, J., Lu, W. and Ou, J.H. (2003) Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol*, **77**, 1578-1583.
- Xu, Z., Choi, J., Yen, T.S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M.J. and Ou, J. (2001) Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *Embo J*, **20**, 3840-3848.
- Yagnik, A.T., Lahm, A., Meola, A., Roccasecca, R.M., Ercole, B.B., Nicosia, A. and Tramontano, A. (2000) A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins*, **40**, 355-366.
- Yalaoui, S., Zougbede, S., Charrin, S., Silvie, O., Arduise, C., Farhati, K., Boucheix, C., Mazier, D., Rubinstein, E. and Froissard, P. (2008) Hepatocyte permissiveness to Plasmodium infection is conveyed by a short and structurally conserved region of the CD81 large extracellular domain. *PLoS Pathog*, **4**, e1000010.
- Yamaji, K., Ikegami, H., Fujisawa, T., Noso, S., Nojima, K., Babaya, N., Itoi-Babaya, M., Makino, S., Sakamoto, T. and Ogiwara, T. (2005) Evidence for Cd101 but not Fcgr1 as candidate for type 1 diabetes locus, Idd10. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 536-542.
- Yan, Y., Shirakabe, K. and Werb, Z. (2002) The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J Cell Biol*, **158**, 221-226.
- Yanagi, M., Purcell, R.H., Emerson, S.U. and Bukh, J. (1997) Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8738-8743.
- Yancey, P.G., Rodriguez, W.V., Kilsdonk, E.P., Stoudt, G.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C. and Rothblat, G.H. (1996) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux. *J Biol Chem*, **271**, 16026-16034.
- Yanez-Mo, M., Alfranca, A., Cabanas, C., Marazuela, M., Tejedor, R., Ursa, M.A., Ashman, L.K., de Landazuri, M.O. and Sanchez-Madrid, F. (1998) Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol*, **141**, 791-804.
- Yanez-Mo, M., Mittelbrunn, M. and Sanchez-Madrid, F. (2001) Tetraspanins and intercellular interactions. *Microcirculation*, **8**, 153-168.
- Yang, W., Qiu, C., Biswas, N., Jin, J., Watkins, S.C., Montelaro, R.C., Coyne, C.B. and Wang, T. (2008) Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus. *J Biol Chem*, **283**, 8643-8653.
- Yang, X., Claas, C., Kraeft, S.K., Chen, L.B., Wang, Z., Kreidberg, J.A. and Hemler, M.E. (2002) Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell*, **13**, 767-781.
- Yang, X., Kovalenko, O.V., Tang, W., Claas, C., Stipp, C.S. and Hemler, M.E. (2004) Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes. *J Cell Biol*, **167**, 1231-1240.
- Yang, X.H., Kovalenko, O.V., Kolesnikova, T.V., Andzelm, M.M., Rubinstein, E., Strominger, J.L. and Hemler, M.E. (2006) Contrasting effects of EWI proteins, integrins, and

- protein palmitoylation on cell surface CD9 organization. *J Biol Chem*, **281**, 12976-12985.
- Yauch, R.L., Berditchevski, F., Harler, M.B., Reichner, J. and Hemler, M.E. (1998) Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. *Mol Biol Cell*, **9**, 2751-2765.
- Yauch, R.L. and Hemler, M.E. (2000) Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochem J*, **351 Pt 3**, 629-637.
- Yauch, R.L., Kazarov, A.R., Desai, B., Lee, R.T. and Hemler, M.E. (2000) Direct extracellular contact between integrin alpha(3)beta(1) and TM4SF protein CD151. *J Biol Chem*, **275**, 9230-9238.
- Ye, J. (2007) Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. *PLoS Pathog*, **3**, e108.
- Ye, S.Q., Reardon, C.A. and Getz, G.S. (1993) Inhibition of apolipoprotein E degradation in a post-Golgi compartment by a cysteine protease inhibitor. *J Biol Chem*, **268**, 8497-8502.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J. and Lemon, S.M. (2007) Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *J Virol*, **81**, 629-638.
- Yi, M., Tong, X., Skelton, A., Chase, R., Chen, T., Prongay, A., Bogen, S.L., Saksena, A.K., Njoroge, F.G., Veselenak, R.L., Pyles, R.B., Bourne, N., Malcolm, B.A. and Lemon, S.M. (2006a) Mutations conferring resistance to SCH6, a novel hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor. Reduced RNA replication fitness and partial rescue by second-site mutations. *J Biol Chem*, **281**, 8205-8215.
- Yi, M., Villanueva, R.A., Thomas, D.L., Wakita, T. and Lemon, S.M. (2006b) Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2310-2315.
- Yin, X.M. and Ding, W.X. (2003) Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med*, **3**, 491-508.
- Yoshizawa, H., Itoh, Y., Iwakiri, S., Kitajima, K., Tanaka, A., Tachibana, T., Nakamura, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1982) Non-A, non-B (type 1) hepatitis agent capable of inducing tubular ultrastructures in the hepatocyte cytoplasm of chimpanzees: inactivation by formalin and heat. *Gastroenterology*, **82**, 502-506.
- Yu, G.Y., Lee, K.J., Gao, L. and Lai, M.M. (2006) Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol*, **80**, 6013-6023.
- Yu, M.Y., Bartosch, B., Zhang, P., Guo, Z.P., Renzi, P.M., Shen, L.M., Granier, C., Feinstone, S.M., Cosset, F.L. and Purcell, R.H. (2004) Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7705-7710.
- Yuasa, T., Ishikawa, G., Manabe, S., Sekiguchi, S., Takeuchi, K. and Miyamura, T. (1991) The particle size of hepatitis C virus estimated by filtration through microporous regenerated cellulose fibre. *J Gen Virol*, **72 (Pt 8)**, 2021-2024.
- Zein, N.N. (2000) Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*, **13**, 223-235.
- Zeisel, M.B., Koutsoudakis, G., Schnober, E.K., Haberstroh, A., Blum, H.E., Cosset, F.L., Wakita, T., Jaeck, D., Dofoel, M., Royer, C., Soulier, E., Schvoerer, E., Schuster, C., Stoll-Keller, F., Bartenschlager, R., Pietschmann, T., Barth, H. and Baumert, T.F. (2007) Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology*, **46**, 1722-1731.
- Zemni, R., Bienvenu, T., Vinet, M.C., Sefiani, A., Carrie, A., Billuart, P., McDonell, N., Couvert, P., Francis, F., Chafey, P., Fauchereau, F., Friocourt, G., des Portes, V., Cardona, A., Frints, S., Meindl, A., Brandau, O., Ronce, N., Moraine, C., van Bokhoven, H., Ropers, H.H., Sudbrak, R., Kahn, A., Fryns, J.P., Beldjord, C. and

- Chelly, J. (2000) A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat Genet*, **24**, 167-170.
- Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C.M. and McKeating, J.A. (2004a) CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol*, **78**, 1448-1455.
- Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C. and Korber, B. (2004b) Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*, **14**, 1229-1246.
- Zhang, X.A., Bontrager, A.L. and Hemler, M.E. (2001) Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem*, **276**, 25005-25013.
- Zhang, X.A., He, B., Zhou, B. and Liu, L. (2003a) Requirement of the p130CAS-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/CD82-mediated inhibition of cell migration. *J Biol Chem*, **278**, 27319-27328.
- Zhang, X.A., Kazarov, A.R., Yang, X., Bontrager, A.L., Stipp, C.S. and Hemler, M.E. (2002) Function of the tetraspanin CD151-alpha6beta1 integrin complex during cellular morphogenesis. *Mol Biol Cell*, **13**, 1-11.
- Zhang, X.A., Lane, W.S., Charrin, S., Rubinstein, E. and Liu, L. (2003b) EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res*, **63**, 2665-2674.
- Zhao, L.J., Wang, L., Ren, H., Cao, J., Li, L., Ke, J.S. and Qi, Z.T. (2005) Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. *Exp Cell Res*, **305**, 23-32.
- Zhao, L.J., Zhang, X.L., Zhao, P., Cao, J., Cao, M.M., Zhu, S.Y., Liu, H.Q. and Qi, Z.T. (2006) Up-regulation of ERK and p38 MAPK signaling pathways by hepatitis C virus E2 envelope protein in human T lymphoma cell line. *J Leukoc Biol*, **80**, 424-432.
- Zhao, L.J., Zhao, P., Chen, Q.L., Ren, H., Pan, W. and Qi, Z.T. (2007) Mitogen-activated protein kinase signalling pathways triggered by the hepatitis C virus envelope protein E2: implications for the prevention of infection. *Cell Prolif*, **40**, 508-521.
- Zhao, X., Tang, Z.Y., Klumpp, B., Wolff-Vorbeck, G., Barth, H., Levy, S., von Weizsacker, F., Blum, H.E. and Baumert, T.F. (2002) Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J Clin Invest*, **109**, 221-232.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M. and Deng, H. (2007) Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol*, **81**, 12465-12471.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T. and Chisari, F.V. (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9294-9299.
- Zhou, B., Liu, L., Reddivari, M. and Zhang, X.A. (2004) The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity. *Cancer Res*, **64**, 7455-7463.
- Zhu, G.Z., Miller, B.J., Boucheix, C., Rubinstein, E., Liu, C.C., Hynes, R.O., Myles, D.G. and Primakoff, P. (2002) Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development*, **129**, 1995-2002.
- Zhu, X. and Evans, J.P. (2002) Analysis of the roles of RGD-binding integrins, alpha(4)/alpha(9) integrins, alpha(6) integrins, and CD9 in the interaction of the fertilin beta (ADAM2) disintegrin domain with the mouse egg membrane. *Biol Reprod*, **66**, 1193-1202.
- Zitzmann, N., Mehta, A.S., Carrouee, S., Butters, T.D., Platt, F.M., McCauley, J., Blumberg, B.S., Dwek, R.A. and Block, T.M. (1999) Imino sugars inhibit the formation and secretion of bovine viral diarrhoea virus, a pestivirus model of hepatitis C virus: implications for the development of broad spectrum anti-hepatitis virus agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11878-11882.

Bibliographie

- Ziyyat, A., Rubinstein, E., Monier-Gavelle, F., Barraud, V., Kulski, O., Prenant, M., Boucheix, C., Bomsel, M. and Wolf, J.P. (2006) CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J Cell Sci*, **119**, 416-424.
- Zuppini, A., Groenendyk, J., Cormack, L.A., Shore, G., Opas, M., Bleackley, R.C. and Michalak, M. (2002) Calnexin deficiency and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Biochemistry*, **41**, 2850-2858.

RESUME

Le virus de l'hépatite C (VHC) touche 2 à 3% de la population mondiale et la plupart des individus infectés développent une hépatite chronique qui est fortement associée au développement d'un cancer du foie. Bien que les mécanismes de régulation de l'entrée du VHC dans ses cellules cibles, les hépatocytes, soient encore très mal connus, plusieurs protéines de surface cellulaire ont été identifiées comme des facteurs nécessaires à l'entrée virale. Parmi ces protéines, la tétraspanine CD81 est essentielle à l'entrée du VHC. Les membres de la famille des tétraspanines ont la particularité de s'associer entre eux et avec d'autres protéines, appelées partenaires, pour former des complexes multimoléculaires dans des microdomaines appelés microdomaines enrichis en tétraspanines (TEM). Dans notre étude, nous avons analysé le rôle de CD81 et de ses protéines associées dans le mécanisme d'entrée du VHC. En effet, nous avons identifié un nouveau partenaire de CD81, EWI-2wint, qui inhibe l'infection par le VHC, et nous avons analysé le rôle de la fraction de CD81 associée aux TEM dans l'infection par le VHC.

Dans un premier temps, nous avons donc montré qu'EWI-2wint, un nouveau partenaire de CD81, est exprimé dans différentes lignées cellulaires mais pas dans les hépatocytes. L'expression ectopique d'EWI-2wint dans des Huh-7, une lignée de cellules hépatiques susceptibles à l'infection par le VHC, bloque l'entrée virale. Nous avons pu montrer que ce blocage se fait par une inhibition de l'interaction entre CD81 et les glycoprotéines d'enveloppe présentes à la surface des particules virales. Notre travail suggère ainsi que l'hépatotropisme du VHC ne serait pas lié uniquement à la présence de facteurs d'entrée spécifiques, mais également à l'absence du facteur inhibiteur EWI-2wint. Ce type de mécanisme de contrôle de l'entrée virale par un inhibiteur cellulaire n'avait jamais été décrit auparavant.

En parallèle, en utilisant des particules du VHC hautement infectieuses produites en culture cellulaire, nous avons isolé des clones cellulaires indépendants présentant des niveaux d'infection variables. Parmi ces clones, un clone résistant à l'infection avait perdu l'expression de CD81 (cellules Huh-7w7). L'expression ectopique de la CD81 humaine (hCD81) dans ce clone a permis de restaurer la permissivité en Huh-7. De manière intéressante, l'expression ectopique de la CD81 d'origine murine (mCD81) dans les cellules Huh-7w7 a également permis de restaurer la permissivité au virus, suggérant que la mCD81 dans un contexte cellulaire humain est capable de mimer la hCD81 dans le mécanisme d'entrée du VHC et probablement dans les interactions avec les facteurs cellulaires. Nous avons donc utilisé ces cellules exprimant la mCD81 et des anticorps monoclonaux décrits précédemment, MT81/MT81w, pour analyser le rôle de CD81 associée aux TEM dans l'infection par le VHC. L'anticorps MT81w, qui reconnaît uniquement CD81 associée aux TEM, n'inhibait pas l'infection et la déplétion des cellules en cholestérol, qui inhibe l'infection, n'affectait pas les niveaux de CD81 associée aux TEM. De manière similaire, le traitement des cellules avec de la sphingomyélinase, qui réduit l'infection, augmentait les niveaux de CD81 associée aux TEM. En résumé, nous avons montré que l'entrée du VHC dans ses cellules cibles est directement liée au niveau d'expression de CD81 et la sous-population de CD81 associée aux TEM ne semble pas participer aux étapes initiales du cycle viral du VHC.

Mots clés : VHC, mécanisme d'entrée, tétraspanine, CD81, EWI-2wint, TEM