



**HAL**  
open science

# Etude de la réponse humorale neutralisante contre le Virus de l'Hépatite C

Ndiémé Ndongo Ndongo Thiam

► **To cite this version:**

Ndiémé Ndongo Ndongo Thiam. Etude de la réponse humorale neutralisante contre le Virus de l'Hépatite C. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT: 2010LYO10019 . tel-00840367

**HAL Id: tel-00840367**

**<https://theses.hal.science/tel-00840367>**

Submitted on 2 Jul 2013

**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.

N° d'ordre : 19/2010

Année 2010

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Présentée par

**Mme Ndiémé NDONGO THIAM**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

(arrêté du 7 août 2006)

**ETUDE DE LA REPONSE HUMORALE NEUTRALISANTE  
CONTRE LE VIRUS DE L'HEPATITE C**

Soutenue publiquement le 11 Février 2010

A l'INSERM U871

Devant le jury composé de :

Pr Christian TRÉPO	Président du jury
Pr Façoise STOLL-KELLER	Rapporteur
Dr. Patick MAUREL	Rapporteur
Dr. Geneviève INCHAUSPÉ	Examineur
Pr. Emmanuel DROUET	Examineur
Dr. Marie-Anne PETIT	Directeur de thèse

---



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

**M. le Professeur L. Collet**

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## ***COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard



## RESUME :

Le virus de l'hépatite C (HCV) est l'agent responsable de l'hépatite C, maladie qui touche environ 3% de la population mondiale. Une des caractéristiques de cette infection est son évolution dans 60 à 90% des cas vers des formes chroniques avec des complications sévères telles que la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Un des handicaps majeurs de la recherche sur le HCV est l'absence de systèmes de cultures *in vitro* efficaces et de modèles animaux adaptés car le HCV n'infecte que l'homme et le chimpanzé.

Lors de la maladie, il est couramment admis que 10 à 40% de patients infectés guérissent spontanément de l'hépatite C avec une élimination complète de la virémie, suggérant l'existence d'anticorps neutralisants, capables d'éradiquer le virus *in vivo*. Or la nature et la spécificité de ces anticorps ne sont actuellement pas encore bien connues. Dans notre équipe, un anticorps monoclonal D32.10 a été obtenu après immunisation de souris avec des particules HCV circulantes provenant de patients chroniquement infectés. Cet anticorps est dirigé contre les glycoprotéines d'enveloppe du HCV (E1 et E2) et reconnaît un épitope discontinu composé d'une région dans la protéine E1 (292-306) et deux régions dans la protéine E2 (480-494) et (608-622). Plusieurs études ont montré que ces trois régions étaient hautement conservées entre les différents génotypes, étaient impliquées dans les interactions avec des candidats récepteurs du HCV (CD81 et GAG) et pouvaient constituer des cibles de la réponse cellulaire. Vu l'importance structurale et fonctionnelle de cet épitope E1E2, l'objectif de mon travail de thèse a été de déterminer le rôle potentiellement neutralisant de l'anticorps monoclonal D32.10.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'inhibition de l'entrée et la capacité de neutralisation *in vitro* de l'anticorps D32.10. Pour cela, nous avons développé un test de *cell-binding* et nous avons montré que l'interaction des particules virales sériques (HCVsp) radiomarquées à l'Iode 125 avec les cellules hépatocytaires (Huh-7 et HepaRG) est spécifique et saturable impliquant des sites de haute et faible affinité. De plus, l'anticorps D32.10 est capable d'inhiber spécifiquement et efficacement les interactions de haute affinité entre les HCVsp et les cellules HepaRG avec une  $IC_{50} \leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ . Nous avons mis en évidence que l'inhibition est plus efficace lorsque nous utilisons sélectivement une population de particules HCV enveloppées exprimant fortement E1E2. Récemment, nous avons développé un système d'infection original des cellules HepaRG qui sont des cellules progénitrices du foie par les HCVsp et avons montré que l'infection, la réplication et la propagation dépendent de l'état de prolifération/différenciation de ces cellules. Nous avons aussi démontré que les particules virales produites dans ce système contiennent de l'ARN viral, expriment les protéines d'enveloppe E1E2 et sont infectieuses. Des études préliminaires montrent que l'anticorps D32.10 inhibe fortement l'infection (95% à 80% aux jours 14 et 21 après infection) vraisemblablement au niveau des étapes précoces du cycle viral.

Dans un second temps, nous avons recherché la prévalence des anticorps de même spécificité que le D32.10 (anti-E1E2A,B) dans différents groupes de patients HCV positifs afin de déterminer leur signification biologique. Par un test ELISA utilisant les peptides biotinylés E1, E2A et E2B dans la phase de capture, nous avons démontré que la réponse anticorps anti-E1E2A,B était présente dans 90% des cas chez les patients qui guérissent spontanément avec des titres élevées ( $\geq 1/1000$ ). Cette réponse humorale est absente ou rare (< 10%) chez les patients porteurs chroniques non traités ou non répondeurs aux traitements antiviraux. Une étude longitudinale a été réalisée chez des patients non répondeurs ou répondeurs développant une réponse virologique soutenue à une bithérapie standard, interféron pégylé plus ribavirine. L'analyse statistique des résultats a montré que les anticorps anti-E1E2A,B pouvaient être prédictifs de la réponse au traitement avec une spécificité et une valeur prédictive positive de 100%.

La convergence des résultats *in vitro* et *in vivo* supporte un rôle neutralisant de l'anticorps monoclonal D32.10, permettant d'envisager son utilisation en immunothérapie.

**Mots clés :** virus de l'hépatite C, glycoprotéines d'enveloppe, anticorps monoclonal, neutralisation, cellules hépatocytaires.

## ABSTRACT

Hepatitis C Virus (HCV) is the major etiological agent of liver disease in the world with approximately 180 million people who are seropositive. The majority (60-90%) of infected individuals progresses to chronic hepatitis that increases their risk for developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma. One of the major limitations of HCV research is the lack of efficient *in vitro* culture systems and appropriate animal models.

It is commonly accepted that spontaneous clearance during the acute phase occurs in a minority of subjects (10-40%) without medical treatment. Therefore identification of protective determinants is essential for understanding the role of neutralizing responses in HCV pathogenesis, and for developing vaccines and antibody-based therapies for HCV. In our lab, a monoclonal antibody (mAb) so-called D32.10 was obtained after immunization of mice with serum-derived HCV particles (HCVsp) from chronically-infected patients. This mAb D32.10 recognized a unique discontinuous epitope formed by one sequence between amino acids (aa) 297-306 in the E1 protein, and two sequences between aa 480-494 and 613-621 in the E2 protein, which is expressed on the surface of HCVsp. Several studies have shown that these three regions were highly conserved among different genotypes, were involved in interactions with candidate HCV receptors (CD81 and GAG) and could be targets of the cellular response. Given the structural and functional importance of this epitope E1E2, the objective of my thesis was to determine the potential neutralizing role of monoclonal antibody D32.10.

To study the neutralizing capability of the E1E2-specific D32.10 monoclonal antibody (mAb), an *in vitro* direct cell-binding assay and an infection system of the human HepaRG cell line were developed by using HCVsp. The HepaRG cells possess potent ability to acquire a mature hepatocyte phenotype. The E1E2-specific mAb D32.10 was shown to inhibit efficiently and specifically high affinity-interactions through glycosaminoglycans and the CD81 tetraspanin between HCVsp and HepaRG cells with an IC<sub>50</sub> = 0.5 µg/ml. This inhibition was more efficient when E1E2-positive enveloped HCVsp were used selectively for binding studies (IC<sub>50</sub> < 0.5 µg/ml). Establishment of infection, replication and propagation of HCVsp were shown to depend on the proliferation/differentiation stage of HepaRG cells. Persistent HCV infection in HepaRG cells could be obtained with production of E1E2/RNA(+) infectious HCV particles. Preliminary data showed a complete early inhibitory effect of the D32.10 mAb on virion RNA production in HepaRG culture supernatants (95% at D14 and 80% at D21 post-infection).

Furthermore, the detection of the anti-E1E2/D32.10-binding peptide antibodies during natural HCV infection demonstrated significant prevalence (90%) of these antibodies: (1) in patients who recovered spontaneously from HCV infection with high titers compared to patients with chronic hepatitis C, and (2) in patients who are complete responders compared to non responders to antivirals. Kinetic analyses revealed that the anti-E1E2/D32.10-like humoral response appeared very early with high titers ( $\geq 1/1000$ ) and was associated with complete virus eradication. The positive and negative predictive values (ROC curve analysis) for achieving or not a sustained viral response to antiviral therapy are 100% and 86%, respectively, reflecting diagnostic accuracy. The anti-E1E2/D32.10-binding peptide antibodies may thus predict the outcome of HCV infection and represent a new relevant prognostic marker in serum for the HCV diagnosis.

Convergence of *in vitro* and *in vivo* data strongly support the neutralizing activity of the D32.10 mAb, and thus immunotherapeutic potential of this unique anti-E1E2 D32.10 mAb.

Keys words : Hepatitis C virus, envelope glycoproteins, monoclonal antibody, neutralisation, human hepatocytes

Je remercie vivement les membres du jury pour m'avoir consacré une partie de leur temps précieux et me faire l'honneur de juger cette thèse :

Le Professeur **Christian Trépo**, en qualité de président du jury

Le Professeur **Françoise Stol-Keller** et le Docteur **Patrick Maurel** en qualité de rapporteurs

Le Docteur **Geneviève Inchauspé** et le Professeur **Emmanuel Drouet** en qualité d'examineurs

Le Docteur **Marie-Anne Petit** en qualité de directeur de thèse



Je remercie le Pr. **Fabien Zoulim**, directeur de l'INSERM U871, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je renouvelle mes sincères remerciements à **Marie-Anne Petit**, ma directrice de thèse pour m'avoir encadré tout au long de ces années. Votre rigueur et votre sens critique m'ont permis de mener à bien ce travail de recherche. Sans vous, évidemment rien de tout ça n'aurait été possible. J'ai beaucoup apprécié nos longues discussions. Merci Marie-Anne pour tout ce que vous m'avez enseigné. Je garderai de vous l'image d'une femme généreuse, intelligente, battante et très sensible.

Je tiens à témoigner mon infinie gratitude envers le Pr. **Christian Trépo**, ancien directeur de notre laboratoire. Merci d'avoir cru en moi et à mon projet et d'avoir consacré tant de temps dans notre collaboration. Vous resterez à jamais une référence pour moi. Un grand merci à **Ludmila Trépo**.

Je remercie aussi tous les membres de notre équipe. Un merci particulier à **Pascale Berthillon** pour ta gentillesse, tes conseils et pour avoir été une complice durant ces années. Je n'oublierai jamais notre séjour chez les canadiens. Merci également à **Sylvie de Sequiera** pour m'avoir formé à la paillasse. Tu m'as initié à beaucoup de techniques. Merci pour m'avoir encouragée, écoutée et supportée du début jusqu'à ton départ à la retraite qui a créé un grand vide dans notre équipe. Un grand merci à **Isabelle Bordes** et **Françoise Berby** pour m'avoir parfois épargné le grand nord (chambre à -20°C). Merci pour votre aide précieuse et pour votre disponibilité. Merci également à **Magali Maire** pour avoir été une grande sœur.

L'environnement de travail a été un facteur primordial pour la bonne réussite de cette thèse. Merci à ceux qui ont contribué à rendre cet environnement agréable : **Christian Pichoud** (mon cri-cri d'amour), **Ghada**, **les 2 Fabiens**, **Gaétan**, **Sarah**, **Paul Deny**, **Myriam**, **Malika**, **Thierry**, **Lucyna**, **Christine**, **Tatiana**, **Romance**, **Maud** ...

Un grand merci à **Keira** qui a été une deuxième maman et une bonne conseillère.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont apporté leur aide et leur soutien. Merci à mes amis, **Amico**, **Faty**, **Oumou**, **Khadim**, **Pape Cissé**, **Soutou**, **Gaëlle**, **Youssou**, **Pape Ousmane**, **Bineta**, **Fatou kiné**, **Adji penda**, **Yama**, **Mor Sarr**, **Pisco**, **Mamadou**, **Samba**, **Daba**...

Je ne serais pas là aujourd'hui sans les personnes que je souhaite remercier maintenant. Merci à mes **parents**, sans vous et votre soutien je ne serai pas arriver là où j'en suis aujourd'hui. Vous m'avez toujours laissé libre dans mes choix et vous avez toujours cru en moi. Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait. Vous resterez à jamais dans mon cœur. Merci aussi à mes beaux parents (**Yaye et Papeu**), à mes tantes (**Tata Aida, Tata Adama, Adja, Yaf**) et à mon oncle (**Tonton Anis**).

Un grand merci à mes sœurs (**Khady & Racky**), à mes frères (**Thierno & Mamadou**) et à mes deux neveux (**Yaya et Saliou**). J'ai toujours pu compter sur vous.

Enfin, je ne peux terminer sans remercier les deux personnes qui comptent le plus dans ma vie. **Assane**, mon époux, ton aide et ton soutien ont été des éléments déterminants pour la réalisation de mon projet. Tu m'as toujours tiré vers le haut, tu as toujours su m'écouter et me conseiller. Merci pour tout et sois assuré de mon Amour. **Talla**, mon fils, tu es mon moteur. Tu me donnes chaque jour la force de me lever, d'avancer et de me surpasser.... Tu es la plus belle chose qui me soit arrivée dans la vie. Cette thèse vous est dédiée mes deux amours.

# SOMMAIRE

---

<b>SOMMAIRE</b> .....	3
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	15
<b>ABBREVIATIONS</b> .....	17
<b>INTRODUCTION</b> .....	21
<b>CHAPITRE I – GENERALITES SUR LE VIRUS DE L’HEPATITE C</b> .....	4
1. HISTOIRE NATURELLE DE L’HEPATITE C .....	6
1.1. Découverte du virus .....	6
1.2. Epidémiologie .....	7
1.3. Physiopathologie .....	8
1.3.1. La phase aiguë .....	9
1.3.2. La résolution de l’infection .....	10
1.3.3. La phase chronique .....	10
1.4. Traitements contre le HCV .....	11
1.4.1. Traitement actuel .....	11
1.4.2. Essais cliniques .....	13
1.4.2.1. La valopicitabine ou NM 283 .....	13
1.4.2.2. Les inhibiteurs de protéase .....	13
2. BIOLOGIE DU VIRUS DE L’HEPATITE C .....	13
2.1. Classification phylogénétique .....	13
2.2. Organisation génomique .....	14
2.2.1. La région 5’ non codante .....	15
2.2.2. Le cadre ouvert de lecture .....	16
2.2.3. La région 3’ non codante .....	16
2.3. Structure et fonction des protéines virales .....	17
2.3.1. Protéines structurales .....	17
2.3.1.1. La protéine de la capsid (C) .....	17
2.3.1.2. Les glycoprotéines d’enveloppe E1 et E2 .....	18
2.3.2. Les Protéines non structurales .....	20

2.3.2.1. La protéine NS2 .....	20
2.3.2.2. La protéine NS3 .....	21
2.3.2.3. La protéine NS4A.....	22
2.3.2.4. La protéine NS4B.....	22
2.3.2.5. La protéine NS5A.....	23
2.3.2.6. La protéine NS5B.....	23
2.3.3. Autres protéines .....	24
2.3.3.1. La protéine P7 .....	24
2.3.3.2. La protéine F ou ARFP .....	25
2.4. Classification et variabilité du HCV .....	26
2.4.1. Classification des géotypes .....	26
2.4.2. Distribution géographique des géotypes.....	27
2.4.3. Conséquences cliniques des géotypes du HCV .....	28
2.4.3.1. Géotype et pathogénèse.....	28
2.4.3.2. Géotype et réponse au traitement anti-viral.....	29
2.5. Le Cycle viral.....	30
2.5.1. Les étapes précoces du cycle viral.....	31
2.5.1.1. Attachement et entrée de la particule virale .....	32
2.5.1.2. Internalisation de la particule virale.....	37
2.5.2. Traduction et maturation de la polyprotéine .....	38
2.5.2.1. Traduction de la polyprotéine .....	38
2.5.2.2. Maturation de la polyprotéine .....	39
2.5.3. Réplication du génome viral.....	39
2.5.4. Assemblage et sécrétion des virions néoformés .....	42
3. MODELES D'ETUDE DU HCV.....	44
3.1. Le virus natif dérivé de sérum de patients HCV (+) .....	44
3.2. Les modèles viraux existants .....	45
3.2.1. La protéine E2 recombinante .....	45
3.2.2. Les réplicons génomiques/subgénomiques.....	45
3.2.3. Les particules virus-like ou HCV-LPs .....	46
3.2.4. Les pseudos particules ou <i>HCVpp</i> .....	47
3.2.5. Le système de propagation du virus en culture cellulaire, HCVcc.....	49
3.3. Les modèles cellulaires .....	51
3.3.1. Lignées cellulaires pour l'étude du HCV .....	52
3.3.2. Culture d'hépatocytes humains fœtaux (HFH) .....	53

3.3.3. Culture primaires d'hépatocytes humains (PHH).....	54
3.4. Les modèles animaux.....	56
3.4.1. Le chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> ) .....	56
3.4.2. Tupaia ( <i>Tupaia belangeri</i> ).....	57
3.4.3. La souris .....	58
3.4.3.1. Modèle de souris transgéniques .....	58
3.4.3.2. Modèle de souris humanisées.....	59
4. Réponse immunitaire contre le HCV.....	63
4.1. Mécanismes de défense de la cellule hôte .....	63
4.1.1. La réponse innée .....	63
4.1.2. La réponse adaptative.....	65
4.2. Persistance de l'infection virale .....	69
4.2.1. HCV interfère avec la reconnaissance immunitaire innée .....	69
4.2.2. HCV interfère avec l'activation de la réponse adaptative par les cellules du système innée .....	70
4.2.2.1. Inhibition des cellules dendritiques.....	70
4.2.2.2. Les cellules NK.....	71
4.2.3. Mécanismes d'échappement à la réponse adaptative.....	72
4.2.3.1. Evasion de la réponse humorale par le HCV.....	72
4.2.3.2. Evasion de la réponse cellulaire par le HCV .....	73
4.3. La réponse humorale neutralisante .....	75
<b>CHAPITRE II - OUTILS D'ETUDE.....</b>	<b>78</b>
1. L'ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-HCV E1E2/D32.10 (Petit et al., JBC 2003) .....	80
2. LES PARTICULES VIRALES C DERIVEES DU SERUM DE PATIENTS ou HCVsp (Petit et al., Virology 2005) .....	81
3. LES CELLULES PROGENITRICES DU FOIE, HepaRG (Gripon et al., PNAS 2002 ;Parent et al., Gastroenterol 2004 ;Maire et al., BBRC 2008) .....	83
4. OBJECTIFS DES TRAVAUX.....	85
<b>CHAPITRE III - RESULTATS.....</b>	<b>88</b>
1. ARTICLE 1 : L'inhibition des interactions entre les particules HCV sériques (HCVsp) et les hépatocytes humains par l'anticorps monoclonal anti-E1E2/D32.10 .....	90
2. ARTICLE 2 : L'établissement de l'infection, la production et la propagation du Virus de l'Hépatite C sérique dépendent de l'état de prolifération/ différenciation de cellules humaines Progénitrices dU foie : Inhibition par l'anticorps monoclonal anti-E1E2/D32.10 .....	104

3. ARTICLE 3 - Expression de E1E2 sur les particules libérées à partir de culture primaires d'hépatocytes provenant de foie de patients cirrhotiques.....	122
4. ARTICLE 4 - Association des anticorps anti-E1E2 à la guérison spontanée ou à la réponse virologique soutenue aux traitements antiviraux au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C.....	148
<b>CHAPITRE IV - DISCUSSION .....</b>	<b>184</b>
<b>CONCLUSION &amp; PERPECTIVES .....</b>	<b>198</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>204</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

Figure 1 : Histoire du virus de l'hépatite C [Moradpour et al., 2001] .....	6
Figure 2 : Distribution mondiale du HCV en 2003 (d'après les données du W.H.O 2003) .....	7
Figure 3: Histoire naturelle de l'infection par le HCV .....	8
Figure 4: Profil sérologique d'une hépatite C aiguë.....	9
Figure 5 : Profil sérologique d'une hépatite C chronique.....	11
Figure 6 : Historique du traitement de l'hépatite chronique C [Pawlotsky et al., 2004] ..	12
Figure 7: Représentation schématique de l'organisation génomique et protéique du HCV. .....	14
Figure 8: Repliement secondaire de l'IRES du HCV (d'après Lemon et al., 2007).....	15
Figure 9: Repliement secondaire de l'extrémité 3'NC du HCV (d'après Lemon et al. 2007). .....	17
Figure 10: Arbre phylogénétique des différents génotypes du virus de l'hépatite C [Timm and Roggendorf, 2007] .....	27
Figure 11: Distribution mondiale des génotypes (1 à 6) du HCV (Source: Clinical Gastroenterol Hepatol 3: S97). .....	28
Figure 12: Représentation schématique du cycle de réplication du HCV [Moradpour et al., 2007]. .....	30
Figure 13: Modèle de l'entrée du HCV [Moradpour et al., 2007]. .....	31
Figure 14: Complexe de réplication du HCV [Moradpour et al., 2007].....	41
Figure 15: Représentation schématique du virus de l'hépatite C.....	42
Figure 16: Système des pseudoparticules rétrovirales HCVpp [Bartosch et al., 2003a]. .....	49
Figure 17 : Génération de virions J6 et JFH1 en culture cellulaire et démonstration de leur pouvoir infectieux in vivo [Bukh and Purcell, 2006]. .....	51
Figure 18: Pan troglodytes.....	57
Figure 19: Tupaia belangeri .....	58
Figure 20 : Modèle de souris chimériques Alb-uPA/SCID pour l'étude du HCV. ....	62
Figure 21: Voies de signalisation de la réponse innée induites par le HCV [Sklan et al., 2009]. .....	65
Figure 22: Induction de la réponse des cellules T cytotoxiques (CTL) spécifiques du HCV [Hiroishi et al., 2008].....	68
Figure 23: Effets des protéines du HCV sur la réponse immunitaire [Hiroishi et al., 2008] .....	74
Figure 24: Caractérisation des particules HCV sériques ou HCVsp [Petit et al., 2005]. ....	82
Figure 25: Cinétique morphologique des cellules HepaRG (Parent et al., 2004).....	84
Figure 26: Importance fonctionnelle & structurale de l'épitope D32.10.....	86

Figure 27: Interactions entre les particules HCVsp et les cellules HepaRG : Capacité de neutralisation in vitro et in vivo de l'anticorps D32.10 ? .....	87
Figure 28: Inhibition des interactions entre les particules HCVsp et les cellules hépatocytaires par l'anticorps monoclonal D32.10.....	95
Figure 29: Expression de SR-BI sur les cellules d'origine hépatique. ....	106
Figure 30 : Expression de LDL-récepteur sur les cellules hépatiques.....	107
Figure 31: Expression de la protéine CD81 à la surface des cellules HepaRG).....	108
Figure 32: Protocole expérimental d'infection des cellules HepaRG .....	109
Figure 33: Cinétique de production d'ARN du HCV. ....	110
Figure 34: Titration de l'activité antigénique E1E2 des particules virales.....	111
Figure 35: Ultracentrifugation isopycnique en gradient d'iodixanol.....	112
Figure 36: Analyse des différentes populations virales.....	113
Figure 37: Réinfection des cellules naives .....	114
Figure 38: Localisation des antigènes viraux dans les cellules infectées. ....	115
Figure 39: Caractéristiques des particules provenant des cellules chroniquement infectées (HCVsp-RG).....	116
Figure 40: Etude morphologique et localisation intra-cellulaire des antigènes viraux dans les cellules infectées .....	118
Figure 41: Inhibition de l'infection par l'anticorps monoclonal D32.10.....	119
Figure 42 : Infection des cellules HepaRG par les particules HCVsp : inhibition par l'anticorps anti-E1E2/D32.10 .....	120
Figure 43: Caractéristique des particules HCV-lp .....	126
Figure 44 : Test ELISA de détection des anticorps anti-E1E2A,B [Petit et al., 2005]. ....	150
Figure 45 : Pouvoir neutralisant in vivo de l'anticorps anti-E1E2/D32.10.....	153
Figure 46 : Applications thérapeutiques de l'AcMo D32.10.....	203

# ***ABBREVIATIONS***

---

aa	Acide(s) aminé(s)
AcMo	Anticorps monoclonal
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acides gras
ALAT	Alanine aminotransférase
ApoB/E	Apolipoprotéine B/E
ARFP	Alternate reading frame protein
ARN	Acide ribonucléique
ASAT	Aspartate amino transférase
CLDN	Claudine
DBD	Site de liaison à l'ADN
DC	Cellule dendritique
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GAG	Glycosaminoglycanes
GFP	Green fluorescent protein
HBV	Virus de l'hépatite B
HCV	Virus de l'hépatite C
HCVcc	Hepatitis C virus cell-culture
HCVLp	Hepatitis C virus Like-particles
HCVlp	Hepatitis C virus liver-particles
HCVpp	Hepatitis C virus pseudo-particles
HDL	High density lipoprotein
HepaRG	Lignée hépatocytaire humaine
HepG2	Lignée cellulaire humaine d'hépatocarcinome
HS	Héparanes sulfates
Huh-7	Lignée cellulaire humaine d'hépatocarcinome
HVR	Région hyper variable

Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
INF	Interféron
INF-PEG	Interféron pégylé
IRES	Site d'entrée interne du ribosome
IRF-3	Interferon regulatory factor 3
ISG	Interferon stimulated gene
JFH-1	Japanese Fulminant Hepatitis 1
LD	Lipide droplets
LDL	Low density lipoprotein
LDL-R	LDL Récepteur
ME	Microscopie électronique
NC	Région non codante
NS	Protéine non structurale
OCLN	Occludine
ORF	Cadre ouvert de lecture
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerase chain reaction
PKR	Protéine kinase R
PTB	Polypyrimidine tract-binding protein
RdRp	RNA-dependent RNA-polymerase
RE	Réticulum endoplasmique
RIG-1	Retinoic acid inducible gene 1
RT-PCR	Reverse transcription-PCR
SCID	Immunodéficience severe combine
sE2	forme soluble de la glycoprotéine E2 du HCV
SP	Signal peptidase
SPP	Signal-peptide peptidase
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TLR-3	Toll-like receptor 3
TRIF	Toll-interleukin-1 receptor-domain-containing adaptator inducing IFN $\beta$
VAP	Protéine associée aux vésicules

VLDL

Very low density lipoprotein

VSV

Virus de la stomatite vésiculaire



# ***INTRODUCTION***

---



## INTRODUCTION

L'hépatite C est une affection hépatique provoquée par un virus à ARN de la famille des *Flaviviridae*, le virus de l'hépatite C (HCV). Cette infection constitue un problème majeur de santé publique puisqu'elle touche environ 3% de la population mondiale, soit plus de 170 millions de personnes infectés (W.H.O 1999). La transmission du HCV est essentiellement parentérale. Jusqu'en 1990, la transfusion de produits sanguins et de ses dérivés a été la première cause reconnue de la diffusion de l'infection [Alter et al., 1989; Donahue et al., 1992]. Actuellement la cause majeure de contamination est la toxicomanie par voie intraveineuse. La pratique du partage des seringues était très fréquente avant l'épidémie du virus de l'immunodéficience acquise (HIV), expliquant la forte séroprévalence du HCV chez les anciens usagers de drogue par voie intraveineuse, estimée entre 50 et 80 % [Arteaga-Vizcaino et al., 1993; Thomas et al., 2000].

Le risque majeur lié à l'hépatite C est son évolution dans 60 à 90 % des cas vers une hépatite chronique qui est une cause majeure de cirrhose et de cancer primitif du foie (carcinome hépatocellulaire ou CHC). A l'heure actuelle, aucune stratégie de dépistage, de prévention ou de traitement n'a encore réussi à combattre l'infection par le HCV de façon totalement satisfaisante [Gale and Foy, 2005]. La seule thérapie antivirale utilisée repose sur l'association d'interféron pégylé (IFN-PEG) et de ribavirine [Weber, 2007]. Les limites de ce traitement sont son efficacité sur un nombre limité de patients et ses nombreux effets secondaires. En l'absence de thérapie efficace et d'un vaccin, la recherche fondamentale sur le HCV est essentielle afin de comprendre à quelle étape le virus peut être bloqué dans l'organisme, et ainsi être éliminé.

Nous pouvons noter que la recherche sur le HCV a été pendant longtemps confrontée à des obstacles du fait de l'absence 1°) de système de cultures primaires d'hépatocytes, difficiles à obtenir et à standardiser et ne permettant pas une répllication efficace du virus *in vitro* et 2°) de modèles animaux adaptés car le HCV n'infecte que l'homme et le chimpanzé. La majorité des données actuelles reposent donc sur des approches de biologie moléculaire [Castet et al., 2002; Fournier et al., 1998; Rumin et al., 1999].

Le manuscrit est divisé en cinq principales parties. Le chapitre I donne une revue bibliographique sur le virus de l'hépatite C. Le chapitre II décrit les outils originaux développés dans le laboratoire et qui nous ont permis de réaliser cette étude. Le troisième chapitre résume l'ensemble des résultats obtenus aussi bien sur l'étude de la

## INTRODUCTION

réponse humorale neutralisante contre le HCV *in vivo* que sur l'activité inhibitrice/neutralisante de l'anticorps monoclonal (AcMo) anti-E1E2/D32.10 sur les interactions virus-cellule *in vitro*. L'ensemble des résultats sera discuté dans le quatrième chapitre. Enfin, un dernier chapitre sera consacré aux conclusions et perspectives de ces études.

***CHAPITRE I – GENERALITES SUR  
LE VIRUS DE L'HEPATITE C***

---



## 1. HISTOIRE NATURELLE DE L'HEPATITE C

### 1.1. Découverte du virus

Les termes hépatite A et hépatite B ont été introduits en 1947 pour distinguer les hépatites infectieuses (épidémiques) des hépatites sériques (jaunisses) [Mac, 1947]. Cette classification a été adoptée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour remplacer les multiples descriptions appliquées jusqu'alors à ces maladies (World Health Organization 1973). Au milieu des années 1970, le Dr Alter a démontré avec son équipe que la plupart des cas d'hépatites post-transfusionnelles n'étaient pas dus au virus de l'hépatite A ni à celui de l'hépatite B [Alter et al., 1978; Feinstone et al., 2001]. Dès lors, l'existence d'une troisième forme d'hépatite liée à une infection virale a été suspectée [Zuckerman, 1976]. Malgré cette découverte, les efforts de recherche coordonnés au niveau international pour identifier le virus responsable de cette maladie, initialement baptisée hépatite non A non B, sont restés sans résultat pendant une décennie. Au début des années 80, cet agent a été caractérisé comme un microorganisme de 50 nm de diamètre, possédant probablement une enveloppe lipidique [Bradley, 1985; Bradley et al., 1983]. Il aura fallu attendre 1989 et les progrès de la biologie moléculaire pour que le génome du virus responsable des hépatites non-A non-B, devenu depuis le virus de l'hépatite C (HCV), soit entièrement connu [Choo et al., 1989]. La découverte de ce virus a d'ailleurs inauguré une ère nouvelle de la virologie puisque, pour la première fois, le génome d'un agent infectieux a pu être identifié sans que celui-ci ait été isolé ou cultivé *in vitro*. Par la suite, de nombreux outils ont été développés pour mieux comprendre le mode d'action du HCV.

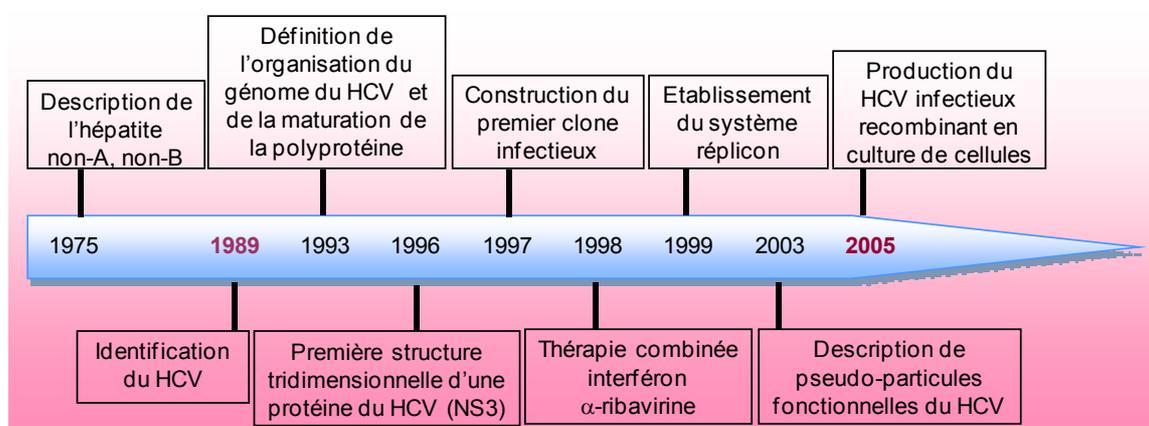
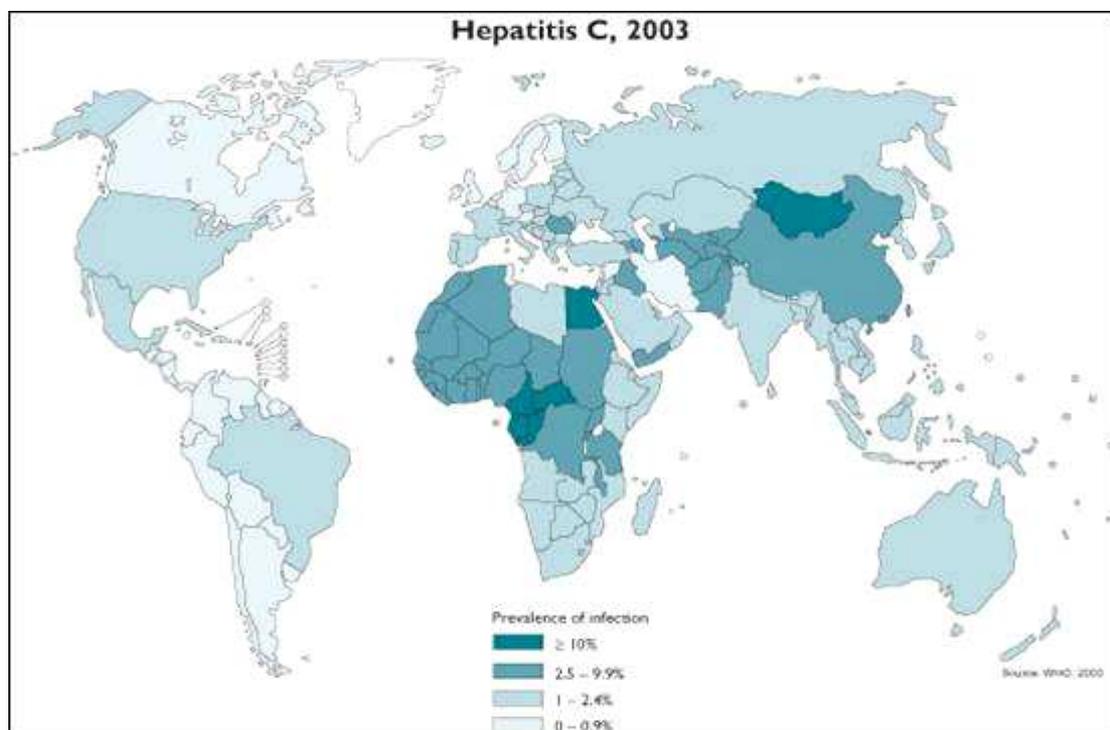


Figure 1 : Histoire du virus de l'hépatite C [Moradpour et al., 2001]

## **1.2. Epidémiologie**

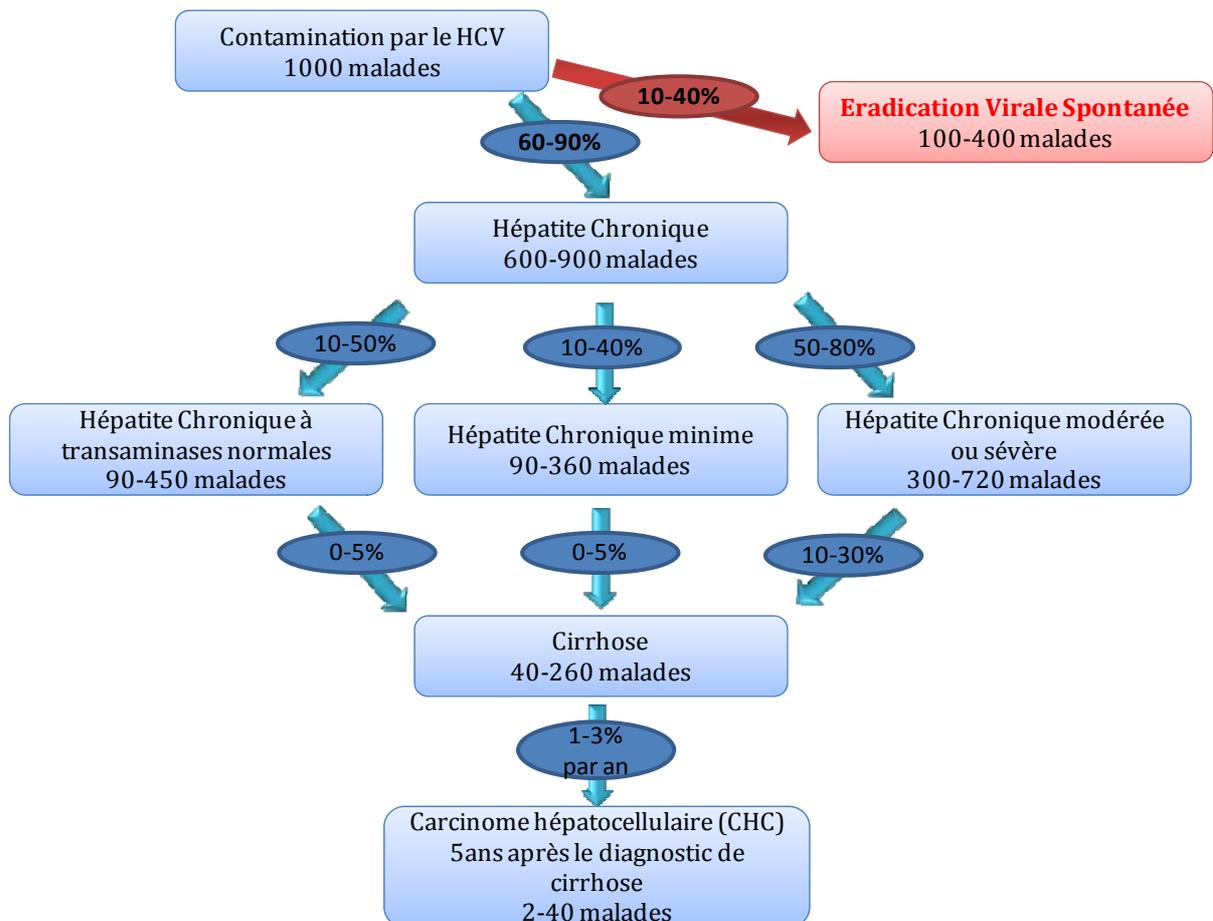
L'hépatite C constitue au niveau mondial un problème majeur de santé publique. La transmission du HCV est essentiellement parentérale et résulte de la mise en contact direct du sang d'un sujet sain avec celui d'un sujet infecté. Les dernières données de l'OMS font état d'une prévalence de 3%, variable d'un continent à l'autre et dépendant également de la population testée [Memon and Memon, 2002]. Les principaux foyers d'infection sont localisés en Afrique et en Asie, où les taux de prévalence atteignent 5 à 6% dans certains pays en voie de développement (**Figure 2**). Dans les pays développés, cette prévalence du HCV est généralement inférieure à 3% (World Health Organization 2003). Au niveau de l'Union Européenne, le nombre de personnes séropositives pour le HCV a été estimé à 2,5 millions [Nalpas et al., 1998]. En France, on estime que 550.000 à 600.000 personnes sont porteuses de ce virus, soit 1 à 1,2% de la population. La plupart des sujets contaminés ne développent aucun symptôme durant les premières phases de l'infection et on estime que plus de la moitié des malades ne connaissent pas leur état sérologique. Des campagnes de dépistage à grande échelle sont donc nécessaires pour proposer des traitements aux individus infectés asymptomatiques et pour éviter la propagation du HCV.



**Figure 2 : Distribution mondiale du HCV en 2003 (d'après les données du W.H.O 2003)**

**1.3. Physiopathologie**

Les étapes successives de l'histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite C (HCV) sont bien connues (**Figure 3**). Après une contamination par le HCV, qui entraîne dans 100% des cas une hépatite aiguë, la grande majorité (60 à 90%) des sujets infectés restent porteurs chroniques du virus. Toutefois, 10 à 40% des patients contaminés sont capables d'éradiquer spontanément le virus. La probabilité de développer une cirrhose pour une personne atteinte d'hépatite C chronique est estimée entre 5-30% après un délai moyen de 15 ans [Sugawara and Makuuchi, 2006]. La stéatose hépatique est une des complications de l'hépatite C chez 30 à 70% des patients, et a été identifiée comme un facteur de risque pour la progression de la fibrose [Asselah et al., 2006a; Negro, 2006]. A long terme, l'inflammation chronique du foie et la fibrose qui conduisent à la cirrhose sont les principaux facteurs d'évolution vers un carcinome hépatocellulaire [Kohara, 2000], avec un risque de 1 à 3% par an et responsable de la mortalité de l'infection.



**Figure 3: Histoire naturelle de l'infection par le HCV**

**1.3.1. La phase aiguë**

L'infection par le HCV se manifeste d'abord par une hépatite C aiguë qui n'est ictérique que dans une minorité des cas (20%) et anictérique avec peu ou pas de symptômes dans la plupart des cas (80%), ce qui explique que le diagnostic soit rarement fait au stade aigu de la maladie. Chez une minorité de patients on retrouve des symptômes non spécifiques, tels qu'une perte de l'appétit, un état de fatigue, des douleurs abdominales, un état pseudo grippal, un prurit ou un ictère. La durée des symptômes est inférieure à 3 mois.

La période d'incubation et la sévérité de l'hépatite aiguë pourraient être liées à l'importance et/ou aux caractéristiques de l'inoculum. L'incubation est variable et serait entre 15 jours et 6 mois. L'hépatite aiguë sévère est rare. Le diagnostic est fondé sur la sérologie virale. Le premier marqueur de l'infection par le HCV est l'apparition d'ARN viral détectable dans le sérum par PCR [Farci et al., 1991; Hino, 1994]. Les anticorps anti-HCV sont détectables au stade aigu de la maladie mais la séroconversion peut également survenir tardivement plusieurs semaines après le pic des transaminases (Figure 4). Les transaminases telles que l'alanine amino transférase (ALAT) et l'aspartate amino transférase (ASAT) s'élèvent avant l'apparition des symptômes, et peuvent atteindre 10 fois la normale.

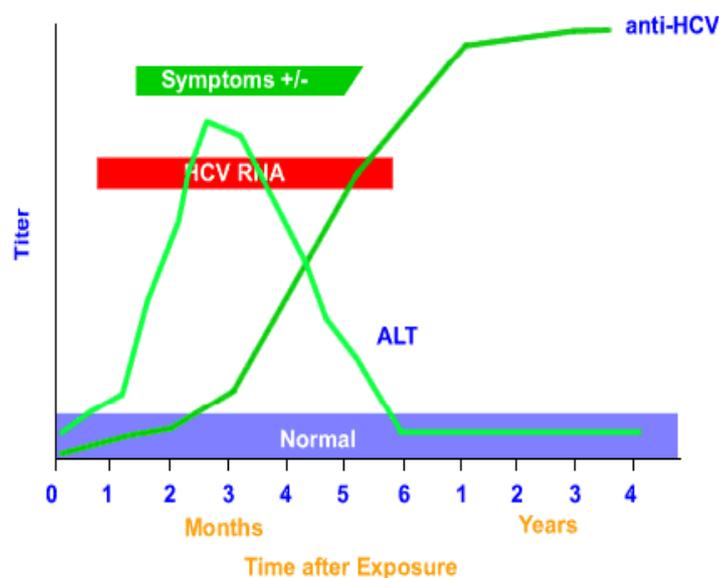


Figure 4: Profil sérologique d'une hépatite C aiguë.

### **1.3.2. La résolution de l'infection**

Suite à la phase aiguë, environ 10-40% des patients guérissent spontanément de l'infection. Cette guérison se traduit par une normalisation des transaminases et une négativation de la virémie. Le titre des anticorps anti-HCV diminue très lentement, mais restent détectables pendant de nombreuses années. Il n'est pas clairement établi si, dans ces conditions, l'infection par le HCV est éradiquée ou si une infection latente peut persister en l'absence d'ARN du HCV détectable dans le sérum. Des études sur de larges cohortes et des tests de détection plus sensibles et informatifs sur le sérum et les lymphocytes seraient utiles. Il est intéressant de noter que la résolution spontanée de l'infection ne protège pas toujours lors d'une réexposition ultérieure, mais réduit les risques de persistance [Mehta et al., 2002].

### **1.3.3. La phase chronique**

Chez la plupart des patients (80%) l'infection par le HCV devient chronique. La sévérité de la maladie est variable et dépend de l'atteinte hépatique. L'infection chronique est alors définie par la persistance de l'ARN du HCV détectable dans le sérum pendant plus de 6 mois après l'hépatite aiguë. Il y a alors persistance de la virémie et maintien élevé des transaminases avec un profil en « dents de scie » (**Figure 5**). On peut distinguer trois formes d'hépatites chroniques C :

- L'hépatite chronique à ALAT normales avec dans environ 90% des patients des lésions d'hépatite chronique à la biopsie hépatique [Persico et al., 2000].
- L'hépatite chronique minime avec une maladie du foie minime, de l'ARN viral détectable dans le sérum par PCR, des transaminases très modérément élevées, parfois fluctuantes et transitoirement normales, et des lésions d'activité et de fibrose minimales
- L'hépatite chronique modérée ou sévère : le pronostic et l'indication du traitement s'établissent par rapport à la biopsie hépatique qui montre des lésions plus marquées d'activité et de fibrose (score Metavir : AxFy). Environ 20% de ces malades développeront une cirrhose en 20 ans [Alter and Seeff, 2000].

## HISTOIRE NATURELLE DE L'HEPATITE C

Nous noterons que la valeur des transaminases n'est pas un bon marqueur de la sévérité de l'infection chronique.

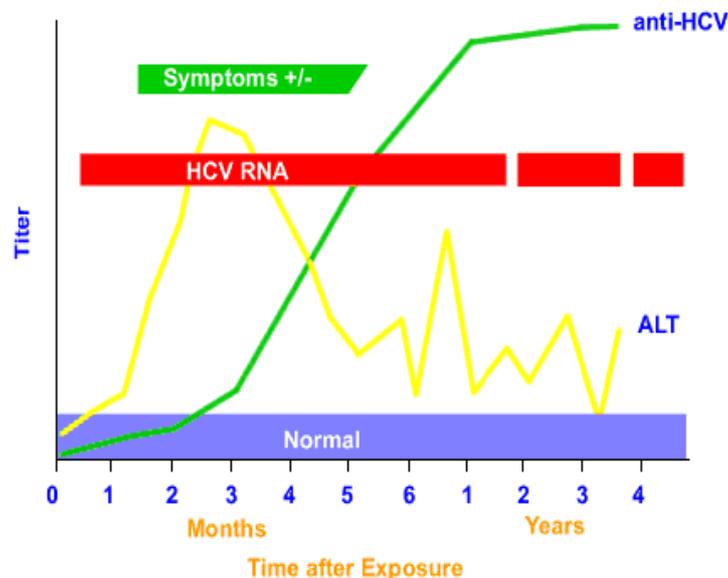


Figure 5 : Profil sérologique d'une hépatite C chronique

### 1.4. Traitements contre le HCV

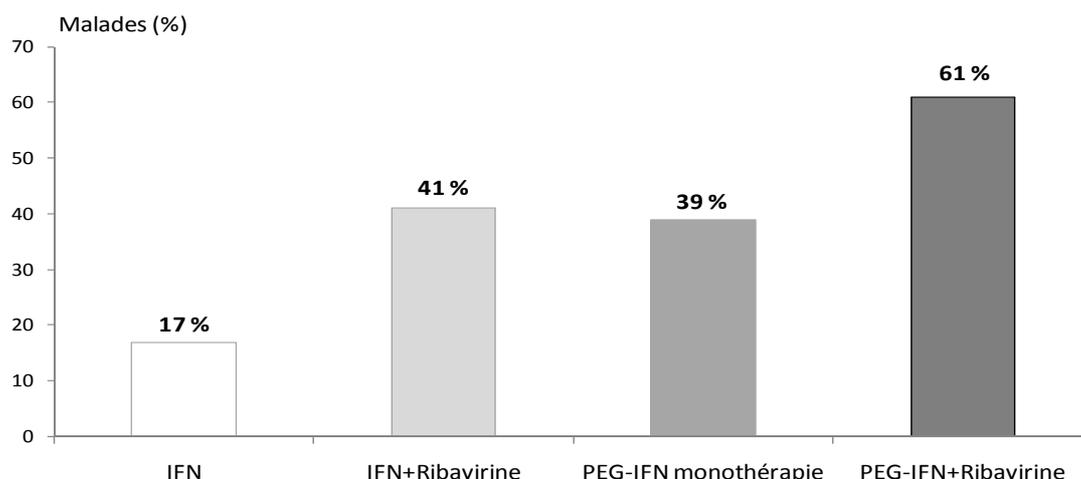
#### 1.4.1. Traitement actuel

Les objectifs des traitements de l'hépatite C sont multiples. En effet, dans le cadre d'une hépatite C aiguë, l'objectif principal est d'éviter le passage à la chronicité de la maladie. Dans le cadre d'une hépatite C chronique, les objectifs sont d'éradiquer le virus, de réduire l'activité de la maladie, diminuer la progression de la fibrose et de prévenir la survenue d'une cirrhose et d'un carcinome hépatocellulaire.

L'interféron (IFN)- $\alpha$  a été initialement utilisé en monothérapie [Poynard et al., 1996]. Une administration tri-hebdomadaire en monothérapie pendant 6 mois à 12 mois permettrait d'obtenir un taux de réponse virologique prolongée globalement faible de l'ordre de 17% (**Figure 6**). Ce pourcentage variait en fonction de certains facteurs virologiques (génotype, virémie quantitative, hétérogénéité génomique) et de facteurs liés à l'hôte (cirrhose constituée, immunosuppression). Ainsi, les infections liées à un génotype 1, et notamment 1b, ne permettaient d'espérer un taux de réponse virologique à long terme que de l'ordre de 5 à 10%, alors que des infections par des génotypes 2 ou 3 étaient éradiquées par l'IFN- $\alpha$  dans environ 30% des cas. A partir de 1995,

## HISTOIRE NATURELLE DE L'HEPATITE C

l'association à l'IFN de la ribavirine, administrée à une posologie quotidienne, a permis d'atteindre environ 41% de réponse virologique prolongée avec les mêmes facteurs prédictifs de réponse que ceux identifiés pour l'IFN en monothérapie [Lai et al., 1996; McHutchison et al., 1998]. La pégylation de l'IFN (fixation d'une molécule de polyéthylène-glycol à la molécule d'IFN) ralentit la résorption du médicament, réduit son élimination et augmente sa demi-vie, permettant d'obtenir, après une injection hebdomadaire, des concentrations sériques d'IFN stables et une pression antivirale constante [Glue et al., 2000]. L'IFN pégylé (PEG-IFN) utilisé en monothérapie permet de doubler l'efficacité de la réponse virologique prolongée chez les malades naïfs traités 48 semaines par rapport à celle observée avec l'IFN standard correspondant [Lindsay et al., 2001; Zeuzem et al., 2001]. Les résultats satisfaisants obtenus avec l'IFN pégylé par rapport à l'IFN standard ont ouverts la voie à des études qui ont testé l'efficacité de l'association IFN pégylé à la ribavirine, qui est aujourd'hui le traitement de référence. Cette combinaison s'est avérée globalement plus efficace que la bithérapie standard avec une tolérance comparable et les résultats suivants : 61% de réponse virologique 6 mois après l'arrêt du traitement (48% en cas de génotype 1 et 88% en cas de génotypes 2 et 3) et 56% d'amélioration histologique des lésions de fibrose, particulièrement après réponse virologique prolongée. L'efficacité thérapeutique est principalement dépendante du génotype et est peu modifiée par le grade de fibrose (International consensus conference on hepatitis C [1999]).



**Figure 6 : Historique du traitement de l'hépatite chronique C [Pawlotsky et al., 2004]**

### **1.4.2. Essais cliniques**

Plusieurs substances susceptibles d'interagir avec le cycle du virus de l'hépatite C sont en cours de développement, afin de disposer de nouveaux traitements qui permettraient d'améliorer l'efficacité et la tolérance de la bithérapie recommandée actuellement (Interféron Pégylé + Ribavirine).

#### *1.4.2.1. La valopicitabine ou NM 283*

La valopicitabine ou NM 283 est un médicament sous licence chez Novartis en cours d'essais cliniques pour le traitement de l'hépatite C. Elle bloque la réplication du virus de l'hépatite C en inhibant spécifiquement l'ARN polymérase du virus. Les essais cliniques phase IIb en cours évaluent l'association de la valopicitabine et de l'interféron pégylé chez les patients atteints d'hépatite C qui n'ont pas répondu à un traitement antiviral antérieur, ainsi que chez les patients qui n'ont pas encore été traités pour l'hépatite C. La valopicitabine entraîne des effets secondaires légers, transitoires chez la plupart des patients, et moins fréquents à des doses inférieures (200 à 400 mg/jour).

#### *1.4.2.2. Les inhibiteurs de protéase*

Le HCV possède une enzyme, la protéase à sérine NS3, qui est essentielle pour sa réplication. Les inhibiteurs de protéase empêchent la réplication virale. A la suite du succès des inhibiteurs de la protéase du virus de l'immunodéficience acquise (HIV), deux inhibiteurs de la protéase du HCV sont aujourd'hui testés chez les patients. Deux molécules font l'objet d'études plus poussées : VX-950 (laboratoire Vertex) et SCH-503034 (Schering Plough). Les résultats préliminaires sont très encourageants, entraînant une diminution de la charge virale plus importante, et on pourrait voir apparaître ces médicaments sur le marché d'ici quelques années.

## **2. BIOLOGIE DU VIRUS DE L'HEPATITE C**

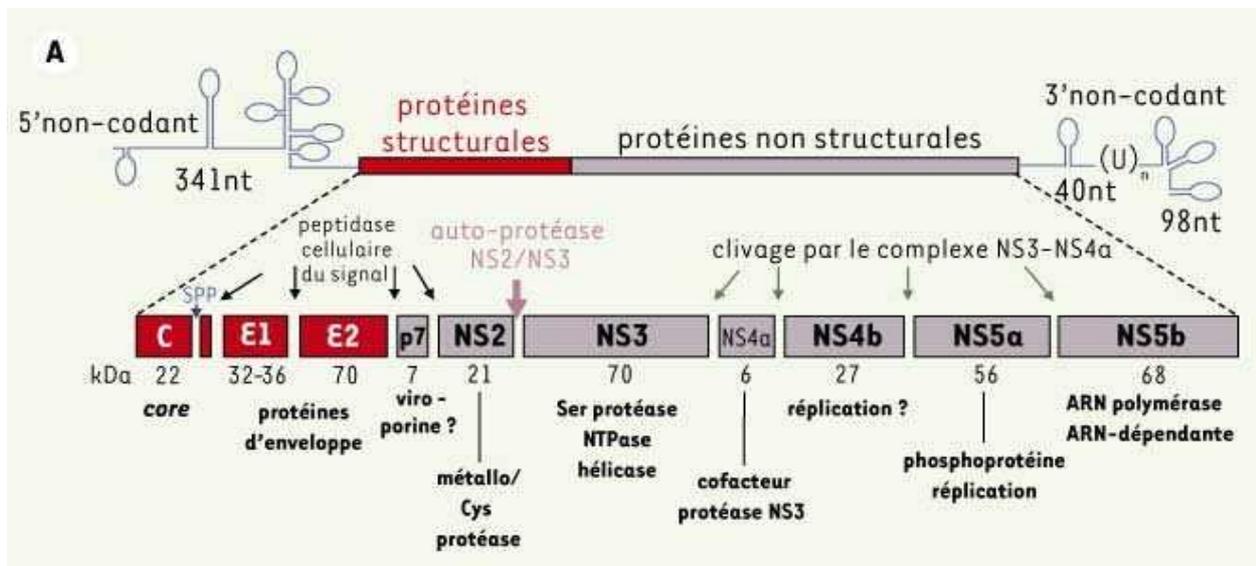
### **2.1. Classification phylogénétique**

Le virus de l'hépatite C appartient à la famille des *Flaviviridae* (du latin *flavus* : jaune) [Choo et al., 1991; Miller and Purcell, 1990]. Cette famille est divisée en plusieurs genres : le genre *flavivirus* qui comprend le virus de la fièvre jaune, le virus de la Dengue, le

virus du Nil occidental, le genre *pestivirus* composé du virus de la diarrhée bovine et du virus de la peste porcine, et le genre *hepacivirus*, dont le HCV est à l'heure actuelle, le seul représentant [Tellinghuisen and Rice, 2002]. Tous les virus de cette famille ont la particularité d'être de petits virus enveloppés dont le génome est un ARN simple brin de polarité positive et dont la traduction conduit à l'expression d'une polyprotéine qui est ensuite clivée par des protéases d'origines cellulaires et virales.

## 2.2. Organisation génomique

Le génome du HCV est un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 9600 bases. Son génome est riche en G-C, ce qui semble indiquer qu'il est sans doute très structuré dans le cytoplasme des cellules infectées et dans les particules virales. Il peut être divisé en trois parties de 5' en 3' (**Figure 7**) : la région 5' non traduite (5'NTR) contenant l'IRES (*internal ribosome entry site*), une phase ouverte de lecture principale codant 10 protéines virales, et la région 3' non traduite (3'NTR).

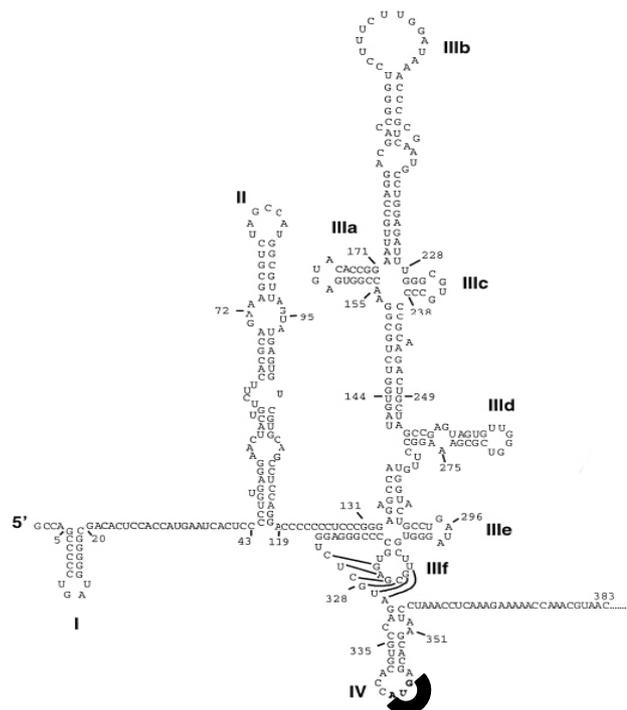


**Figure 7: Représentation schématique de l'organisation génomique et protéique du HCV.**

Le génome du HCV code pour une polyprotéine. Cette région codante est encadrée en 5' par une séquence non codante, contenant un site d'entrée du ribosome (IRES), et en 3' par une séquence non codante essentielle à la réplication virale. La polyprotéine virale est clivée par des peptidases cellulaires pour former des protéines structurales (la protéine de core et les deux protéines d'enveloppe E1 et E2), et par la protéase virale (NS2/NS3) pour former les protéines non structurales (de NS2 à NS5b). Ces protéines non-structurales et structurales sont séparées par une petite protéine hydrophobe appelée p7.

**2.2.1. La région 5' non codante**

L'extrémité 5' est non codante (5'NC), hautement conservée à travers les génotypes et composée d'environ 341 nucléotides. Sa modélisation indique qu'elle fait l'objet d'un repliement complexe en structures réparties en quatre domaines principaux (domaines I à IV) [Smith et al., 1995]. Dans le cas du HCV, la traduction se fait par l'intermédiaire d'un site interne d'entrée du ribosome, IRES (**Figure 8**). Cette région comporte 3 à 5 codons AUG non initiateurs de la traduction, 4 domaines riches en tiges-boucles (le domaine IV contenant le codon AUG initiateur de la traduction du cadre de lecture ouvert) et un pseudo-noeud localisé dans le domaine III [Honda et al., 2000]. L'IRES est constitué par les domaines II, III et IV. Cette structure fixe la sous-unité 40S du ribosome et permet la traduction du cadre de lecture ouvert. Les premiers nucléotides du cadre de lecture ouvert (20 à 40 nucléotides) semblent être impliqués dans le repliement de l'IRES et donc dans son fonctionnement [Rijnbrand et al., 2001].



**Figure 8: Repliement secondaire de l'IRES du HCV (d'après Lemon et al., 2007).**

La 5'NC contient un IRES incluant quatre domaines (I, II, III et IV) et des sous domaines du domaine III (a, b, c, d, e et f). Les tiges-boucles sont indiquées et le codon AUG initiateur est souligné dans la tige-boucle IV.

### **2.2.2. Le cadre ouvert de lecture**

La région 5'NC est suivie d'un large et unique ORF (*open reading frame*) débutant en position 342 par un codon AUG initiateur de la traduction. De taille variable selon les génotypes (9030 à 9099 nt), la région code une polyprotéine précurseur de 3010 à 3033 acides aminés. Sous l'action des protéases cellulaires et virales, cette polyprotéine va se cliver pour donner naissance à des protéines structurales (la protéine de capsid C, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2), une protéine p7 et des protéines non structurales, NS (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, et NS5B) (**Figure 7**). Les structures et fonctions de ces différentes protéines seront détaillées plus bas.

### **2.2.3. La région 3' non codante**

Cette région est composée de 3 domaines de 5' en 3' : une région d'environ 30 nucléotides, variable selon les génotypes, une région poly(U/UC) de longueur variable constituée d'une succession de poly-U et poly-pyrimidique (poly-UC) et une région très structurée de 98 nucléotides, la région X (**Figure 9**) [Blight and Rice, 1997]. Cette dernière est repliée en 3 tiges-boucles et semble jouer un rôle important dans la synthèse du brin non-codant au cours de la réplication. De plus, elle est capable de se lier à des protéines cellulaires, comme la polypyrimidine tract-binding protein (PTB) qui est impliquée dans la traduction médiée par l'IRES [Kolykhalov et al., 1996] mais aussi avec des protéines virales, comme la protéine NS3 [Banerjee and Dasgupta, 2001; Yu et al., 2006].

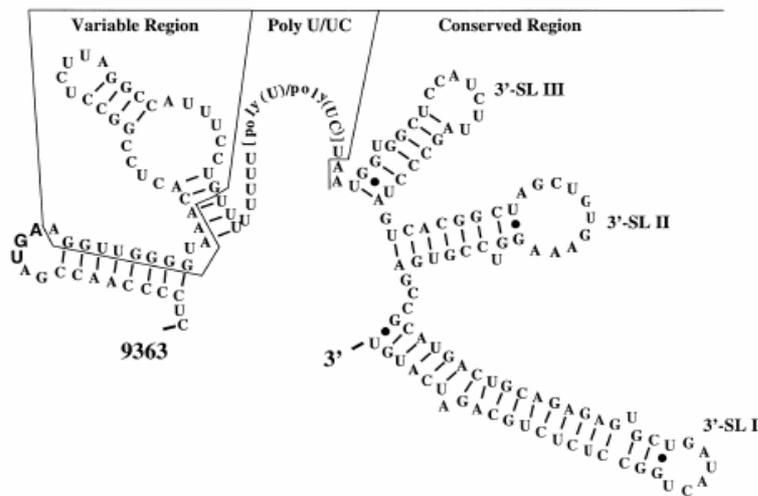


Figure 9: Repliement secondaire de l'extrémité 3'NC du HCV (d'après Lemon et al. 2007).

La séquence en 3' de NS5B et la région variable de l'extrémité 3'NT pourraient former une structure en tige-boucle. SL, tige-boucle. Les régions variables, poly U/UC et la région conservée sont indiquées.

## 2.3. Structure et fonction des protéines virales

### 2.3.1. Protéines structurales

#### 2.3.1.1. La protéine de capside (C)

La protéine de capside (C) est la première protéine codée par le génome du HCV, entre les résidus 1 et 191 de la polyprotéine. C'est une protéine très basique, localisée dans le cytoplasme à proximité des membranes périnuléaires et du réticulum endoplasmique. La protéine de capside existe sous deux formes. Dans une première étape, un clivage protéolytique du peptide signal situé à l'extrémité C-terminale de la protéine donne naissance à la forme « immature », une protéine très basique de 23 kDa (p23), formée des 191 premiers aa de la polyprotéine précurseur (Santolini et al. 1994). Dans une seconde étape, l'action d'une peptidase de peptide signal d'origine cellulaire (SPP pour *Signal Peptide Peptidase*) [McLauchlan et al., 2002; Santolini et al., 1994; Yasui et al., 1998] conduit à une forme dite « mature » de 21 kDa (p21), formée de 179 aa qui résultent du clivage du peptide signal entre les résidus 179 et 180.

D'un point de vue structural, la forme « mature » possède des dimères d'hélice- $\alpha$ , et qui se comporte comme une protéine membranaire [Boulant et al., 2005]. Cette protéine

peut être séparée en deux domaines : un domaine (D1) constitué des deux tiers N-terminaux hydrophiles de la protéine et un domaine (D2) constitué du tiers carboxy-terminal hydrophobe [Boulant et al., 2005]. Le domaine D1 contient de nombreux acides aminés chargés positivement et possède des caractéristiques communes avec les protéines de capsid des *pestivirus* et des *flavivirus* [Boulant et al., 2005; McLauchlan, 2000]. Ce domaine est impliqué, entre autres, dans la fixation de la protéine C avec l'ARN viral et dans son homo-oligomérisation. Le domaine D2 est nécessaire au repliement correct du domaine D1 et est important pour conférer les propriétés membranaires de la protéine C [Boulant et al., 2006; Boulant et al., 2005]. En effet, cette protéine est retrouvée au niveau des membranes, telles que celles du RE, mais aussi à la surface des gouttelettes lipidiques (LD : *Lipid Droplet*) où elle colocalise avec l'apolipoprotéine AII, un composant des LD synthétisé dans le foie dont la fonction est inconnue [Barba et al., 1997].

La protéine de capsid du HCV est multifonctionnelle et est essentielle pour la réplication virale, la maturation et la pathogenèse. L'analyse de sa séquence a montré l'existence d'un site putatif de liaison à l'ADN, de signaux de localisation nucléaire et de sites de phosphorylation. Il a été montré que cette protéine peut interférer avec un certain nombre de processus cellulaires impliqués dans la pathogenèse virale [McLauchlan, 2000; Ray and Ray, 2001]. De plus, elle serait capable de stimuler le phénomène de fibrose menant à la cirrhose [Bataller et al., 2004] et de provoquer un stress oxydatif dans la cellule [Okuda et al., 2002]. En outre, la protéine C peut également interférer avec les mécanismes de défense antivirale de la cellule hôte [Bode et al., 2003]. Enfin, il a été montré que la protéine C avait une activité ARN chaperonne lors de la réplication du génome viral [Ivanyi-Nagy et al., 2006].

### 2.3.1.2. Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont les constituants de l'enveloppe virale. La protéine E1 est une protéine de 33 kDa et qui correspond sur la polyprotéine au résidu 192 à 383 [Fournillier Jacob et al., 1996; Hijikata et al., 1991]. Quant à la protéine E2, c'est une protéine de 70 kDa, qui se situe entre les résidus 384 et 746 de la polyprotéine précurseur. Ces deux protéines sont générées à partir de la polyprotéine

## BIOLOGIE DU VIRUS DE L'HEPATITE C

par clivage protéolytique [Dubuisson and Rice, 1996], grâce à une peptidase signal d'origine cellulaire [Dubuisson et al., 2002].

Ce sont des protéines transmembranaires de type I, avec un large ectodomaine amino-terminal dans la lumière du Réticulum Endoplasmique (RE) et un ancrage hydrophobe carboxy-terminal dans la membrane du RE [Dubuisson et al., 1994]. Ces glycoprotéines sont associées de manière non covalente sous forme d'hétérodimères (Ralston *et al.*, 1993 ; Deleersnyder *et al.*, 1997), et cette association est dépendante des domaines transmembranaires [Op De Beeck et al., 2001]. Les domaines transmembranaires de E1 et E2 sont composés de deux régions hydrophobes séparées par un petit domaine composé de résidus chargés très conservés [Cocquerel et al., 2000]. La deuxième région hydrophobe de E1 agit comme un peptide signal pour la glycoprotéine E2 [Cocquerel et al., 2002]. Après clivage par la signal peptidase cellulaire, la conformation des domaines transmembranaires de E1 change, permettant la localisation cytosolique de son extrémité C-terminale. En plus de la formation des hétérodimères, les domaines transmembranaires sont essentiels pour la rétention au RE [Cocquerel et al., 2001; Cocquerel et al., 1998].

E1 et E2 portent de nombreux résidus N-glycosylés, ce qui leur vaut la dénomination de glycoprotéines d'enveloppe. En effet, la glycoprotéine E1 présente 5 ou 6 sites potentiels de N-glycosylation et la glycoprotéine E2 en possède 9 à 11 selon le génotype [Goffard and Dubuisson, 2003; Zhang and Chelius, 2004]. La N-glycosylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'addition d'oligosaccharides sur des résidus asparagine situés dans un contexte précis Asn-X-Ser/Thr. De nombreuses protéines situées à la surface de virus enveloppés présentent cette modification, qui est supposée jouer un rôle dans la stabilité, l'antigénicité ou les propriétés biologiques des protéines d'enveloppe [Kornfeld and Kornfeld, 1985]. Le rôle de la N-glycosylation dans le cycle viral du HCV n'est pas encore clair [Goffard and Dubuisson, 2003], mais par analogie avec d'autres virus enveloppés, pourrait intervenir dans la voie de sécrétion en préservant la conformation des glycoprotéines ou dans le masquage des épitopes permettant l'échappement au système immunitaire.

Des régions hypervariables (HVR) ont été identifiées dans la séquence de E2 [Weiner et al., 1991]. Ces régions diffèrent jusqu'à 80% d'un génotype à l'autre. Malgré cette

diversité, les propriétés physicochimiques des résidus à certaines positions et la structure globale du domaine sont très conservées [Penin et al., 2001]. La première région hypervariable, HVR1, est constituée des 27 premiers aa de E2. C'est une région très immunogène chez l'homme, qui est soumise à une pression de sélection exercée par le système immunitaire. Un clone du HCV ne possédant pas cette région HVR1 a été montré comme étant infectieux, mais fortement atténué par rapport à la forme sauvage chez le chimpanzé [Forns et al., 2000], indiquant un rôle potentiel de cette région, probablement dans l'entrée virale [Bartosch et al., 2003b; Callens et al., 2005]. En dépit de sa tolérance apparente aux mutations amino-acidiques, les propriétés physicochimiques et la conformation spatiale de la séquence HVR1 sont fortement conservées au sein des complexes protéiques de l'enveloppe [Penin et al., 2001]. Une autre région hypervariable (HVR2) a été décrite dans E2 [Weiner et al., 1991], et cette région pourrait moduler la liaison de E2 à son récepteur [Roccasecca et al. 2003].

Les glycoprotéines du HCV jouent des rôles majeurs à différentes étapes du cycle viral. En effet, elles seraient impliquées dans l'interaction avec les récepteurs cellulaires et dans l'entrée du virus dans les cellules cibles. Ainsi, la protéine E2 joue plusieurs rôles dans la survie de la particule virale dans l'organisme. Elle serait impliquée dans l'adsorption du virus à la surface cellulaire en se liant par son ectodomaine au récepteur cellulaire CD81. La protéine E1 est considérée comme responsable de la fusion entre l'enveloppe virale et l'enveloppe cellulaire. De plus, de par leur exposition à la surface du virion, les protéines d'enveloppe sont des éléments facilement reconnus par les effecteurs de la réponse immunitaire humorale. Elles constituent les cibles majeures des anticorps neutralisants dirigés contre le VHC [Weiner et al., 1992].

### **2.3.2. Les Protéines non structurales**

#### *2.3.2.1. La protéine NS2*

C'est une protéine transmembranaire de 23 kDa, dont le domaine C-terminal est transloqué dans la lumière du RE [Santolini et al., 1995]. Elle s'étend sur la polyprotéine du résidu 810 au résidu 1026 [Grakoui et al., 1993a; Hijikata et al., 1993].

Des études ont montré que la protéine NS2 ne serait pas nécessaire à la réplication de l'ARN viral [Blight et al., 2000; Lohmann et al., 1999]. Cependant, sa fonction principale est le clivage protéolytique à la jonction NS2-NS3. Cette fonction de clivage est portée par une activité protéase à cystéine entre NS2 et la partie N-terminale de NS3. La structure de NS2 après clivage par la protéase NS2/3 révèle que NS2/3 est un dimère comportant deux sites actifs [Lorenz et al., 2006]. Pour chaque site actif, les résidus catalytiques histidine et glutamate sont apportés par l'extrémité C-terminale d'un monomère, alors que la cystéine nucléophile est portée par l'extrémité C-terminale du second. Une grande proximité entre les extrémités C-terminales des deux monomères est donc nécessaire pour que la protéase soit active. Après clivage, les extrémités C-terminales du dimère s'éloignent, ce qui implique que l'activité protéase est perdue après le clivage de la jonction NS2/NS3. D'autres rôles ont été suggérés pour NS2, dans l'apoptose [Erdtmann et al., 2003] et dans la modulation de gènes de transcription [Dumoulin et al., 2003]. Elle semble également être impliquée dans la phosphorylation de NS5A [Liu et al., 1999]. Son interaction avec la caséine kinase, CK2 montre que NS2 a une demi-vie courte, dont la dégradation par le protéasome est régulée par phosphorylation [Franck et al., 2005].

### *2.3.2.2. La protéine NS3*

NS3 est une protéine multifonctionnelle de 70 kDa pouvant exercer trois activités enzymatiques différentes : une fonction sérine protéase dans la partie N-terminale permettant le clivage de la jonction NS2-NS3 et des protéines non-structurales situées en aval [Bartenschlager et al., 1994], et deux activités combinées nucléoside triphosphatase (NTPase)/hélicase localisées du côté carboxy-terminal et jouant un rôle dans la réplication virale [Borowski et al., 2002]. Sur le plan structural, la protéine NS3 ne possède pas de domaine transmembranaire mais est maintenue à la membrane par liaison non covalente avec NS4A. En effet, lorsque que NS3 est exprimée seule, elle est retrouvée de manière diffuse dans le cytoplasme et dans le noyau. Alors qu'en présence de NS4A, la protéase est retrouvée au niveau des membranes du RE et des membranes associées au RE [Wolk et al., 2000].

Le rôle le plus clair actuellement attribué à cette protéine consiste en l'inhibition du facteur IRF3 en réponse à la stimulation du récepteur TLR3 par des ARN double brins. Il

a été démontré qu'il existe une étroite corrélation entre les taux d'expression de ce facteur de transcription des interférons de type I et le niveau de réplication virale [Foy et al., 2003]. De plus, la protéine NS3 a été montrée interagir avec des protéines cellulaires et être impliquée dans les processus de carcinogénèse [Zemel et al., 2000]. Mais son rôle dans l'oncogénèse n'est pas encore démontré.

### 2.3.2.3. La protéine NS4A

NS4A est une petite protéine d'environ 8 kDa. Son rôle de co-facteur de la protéase NS3 est attribué à plusieurs fonctions. Tout d'abord, il possède un domaine transmembranaire dans sa partie N-terminale qui permet l'ancrage de la protéase NS3/4A à la membrane du réticulum endoplasmique [Wolk et al., 2000]. D'autre part, NS4A intervient dans le repliement de NS3, et plus spécifiquement dans la conformation correcte de la partie N-terminale. NS4A est également impliquée dans la protection de la protéase contre les dégradations protéolytiques, et permet une activation de l'activité protéase en changeant la conformation du site catalytique. Il a été montré que NS4A s'accumule dans les mitochondries où elle cause des dommages aboutissant à l'entrée en apoptose des cellules [Nomura-Takigawa et al., 2006].

### 2.3.2.4. La protéine NS4B

NS4B est une petite protéine hydrophobe de 27 kDa avec quatre domaines transmembranaires dont la fonction est encore inconnue [Hugle et al., 2001; Lundin et al., 2003]. Il a été montré que cette protéine pouvait être palmitoylée dans sa région C-terminale [Yu et al., 2007]. La protéine NS4B est essentiellement retrouvée dans la membrane du RE, et ses extrémités N et C-terminales sont cytoplasmiques [Gretton et al., 2005; Hugle et al., 2001; Lundin et al., 2003]. Néanmoins, une fraction des extrémités N-terminales peut être dans la lumière du RE [Lundin et al., 2003]. La région N-terminale de NS4B contiendrait une hélice amphipatique qui permettrait l'association avec les membranes [Elazar et al., 2004]. Il a été montré que NS4B est capable d'induire seule des altérations membranaires spécifiques formant un réseau membranaire (*membranous web*), siège de la réplication virale [Egger et al., 2002; Gao et al., 2004].

D'autre part, cette protéine joue un rôle dans la transformation des cellules [Park et al., 2000].

### 2.3.2.5. La protéine NS5A

NS5A, protéine hydrophile associée aux membranes, existe sous deux isoformes de masse moléculaire de 56 et 58 kDa correspondant à des degrés différents de phosphorylation sur résidus sérine. La fonction principale de NS5A demeure inconnue, même si plusieurs activités lui ont été attribuées. Elle serait importante pour la réplication du génome viral [Blight et al., 2000; Krieger et al., 2001; Seeger, 2005]. En effet, des mutations qui favorisent la réplication virale en culture cellulaire sont retrouvées dans les séquences codant la protéine NS5A. En plus de son rôle dans la réplication du génome viral, l'intérêt porté à NS5A a initialement été son implication potentielle dans la régulation de la réponse à l'IFN [Tan and Katze, 2001]. NS5A interagit avec la PKR et induit la sécrétion d'interleukine 8 (IL-8), une cytokine pro-inflammatoire conduisant à une inhibition des effets antiviraux de l'IFN [Gale et al., 1998; Polyak et al., 2001]. L'activation de la sécrétion de l'IL-8 se fait directement au niveau de son promoteur. Le mécanisme par lequel l'IL-8 s'oppose à l'action de l'IFN reste confus mais implique probablement une inhibition de l'expression des ISG (Interferon stimulated genes).

Au niveau cellulaire, l'interaction de NS5A avec de nombreuses protéines a été démontrée. Ces protéines interviendraient dans l'apoptose, la transduction de signal, l'activation de la transcription et la transformation cellulaire (SNAP, hVAPA, des composants du complexe TFIID, phosphoinoside 3-kinase, ...) [Levrero, 2006].

### 2.3.2.6. La protéine NS5B

NS5B est une protéine phosphorylée de masse moléculaire apparente de 68 kDa, dont la séquence nucléotidique est extrêmement conservée, non seulement dans les différents isolats du HCV, mais aussi chez les pestivirus, les flavivirus et les autres virus à ARN. Elle possède en particulier un motif en acides aminés GDD conservé, caractéristique de toutes les ARN-polymérase ARN dépendantes (RdRP). Ainsi, NS5B serait donc l'ARN polymérase du HCV, son action s'exerçant très probablement au sein d'un complexe

multimoléculaire de réplication, du fait d'interaction directe avec les protéines NS3, NS4 et, par l'intermédiaire de celles-ci avec NS4B et NS5A. L'activité RdRP pourrait être régulée par oligomérisation et hétéromérisation avec d'autres protéines virales.

Avec une localisation cytoplasmique, NS5B est ancrée au niveau du RE grâce à son domaine C-terminal hydrophobe formé de 21 aa [Lohmann et al., 1997]. Sa séquence d'insertion dans la membrane, servant également de domaine d'interaction avec diverses protéines, est indispensable à sa fonction dans le complexe de réplication virale [Ishido et al., 1998; Moradpour et al., 2004; Schmidt-Mende et al., 2001]. La protéine NS5B joue un rôle prépondérant au sein du complexe de réplication du HCV. En effet, elle contribue à la synthèse d'ARN de polarité négative, qui est ensuite utilisé comme matrice et sert à la réplication du génome viral aboutissant à un ARN de polarité positive. D'autre part, NS5B serait aussi impliquée dans la résistance à la ribavirine.

### **2.3.3. Autres protéines**

#### *2.3.3.1. La protéine P7*

C'est une petite protéine hydrophobe de 63 aa (environ 7 kDa) qui est localisée à la jonction entre les protéines structurales et non structurales. Comme sa présence n'était pas requise pour la réplication dans le système réplicon [Blight et al., 2000; Lohmann et al., 1999] ni pour la formation de particules dans le modèle HCV-LPs [Baumert et al., 1998], p7 a longtemps été considérée comme une protéine à part, ni structurale, ni non-structurale.

Elle est localisée dans le RE par deux domaines transmembranaires reliés par une boucle cytoplasmique, et ses extrémités N et C-terminales sont orientées vers la lumière du RE [Carrere-Kremer et al., 2002]. Cette structure et les caractéristiques biologiques qui s'y rattachent ont permis de classer la protéine p7 parmi un groupe de protéines appelées viroporines. Ces protéines forment des canaux ioniques qui pourraient être indispensables aux étapes d'assemblage et/ou de relargage des particules virales. Dans le cas du HCV, il a été montré que p7 était capable de s'assembler en hexamères ou en heptamères pour former un canal ionique sensible à l'effet inhibiteur de l'amantadine,

permettant l'efflux de calcium de la lumière du réticulum vers le cytoplasme [Carrere-Kremer et al., 2002; Clarke et al., 2006; Pavlovic et al., 2003]. Enfin, bien que le polypeptide p7 ne soit pas nécessaire pour la réplication virale, il a été montré qu'il est essentiel pour l'infection du HCV chez le chimpanzé [Sakai et al., 2003]. Elle pourrait constituer une cible potentielle pour le développement de traitements antiviraux.

### 2.3.3.2. La protéine F ou ARFP

En plus des 10 protéines traduites par le génome du VHC sous forme d'une polyprotéine, l'existence d'une protéine additionnelle appelée ARFP (*alternate reading frame protein*) a été décrite [Walewski et al., 2001]. Cette protéine est localisée dans la région périnuléaire du RE [Roussel et al., 2003; Xu et al., 2003] ou dans le noyau (Lo et al., 1995). Elle est codée par un cadre de lecture chevauchant celui de la protéine Core dans la phase +1. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer le mode de synthèse d'ARFP.

Tout d'abord, il a été suggéré que ARFP est produite suite à un événement de décalage de cadre de lecture +1/-2 à proximité du codon 11 de la polyprotéine. Cette observation est basée sur l'existence d'une protéine de 17 kDa traduite *in vitro* à partir de la séquence de Core, alors que les poids moléculaires des formes matures et immatures sont respectivement de 21 et 23 kDa. La caractérisation de la forme de 17 kDa a montré qu'elle possède la même partie N-terminale que Core sur une dizaine d'aa puis que leurs séquences divergent [Xu et al., 2001]. Seul un mécanisme de décalage de cadre de lecture pouvait expliquer ce phénomène. Des éléments de structure ou l'intervention de facteurs viraux ou cellulaires sont nécessaires pour guider sélectivement la traduction en phase +1. D'autre part, de nombreux codons stop sont présents en aval de la région riche en A dans la phase -1, indiquant que si la traduction de cette phase existe, elle est rapidement abortive.

Une étude réalisée par McMullan et collaborateurs a montré que lorsqu'on éteint l'expression de la protéine F chez des chimpanzés, une pression de sélection s'exerce pour sélectionner des révertants rétablissant son expression [McMullan et al., 2007]. Cette protéine F est exprimée lors de l'infection naturelle chez l'homme, comme en témoigne la présence d'anticorps spécifiques dans le sang périphérique [Bain et al.,

2004; Walewski et al., 2001; Xu et al., 2001]. Ceci indique que la réponse immunitaire induite par ARFP est spécifique. Si ARFP induit une réponse anticorps c'est qu'elle est effectivement présente lors de l'infection, mais aucune étude n'a pu démontrer son existence. Cependant, elle ne semble pas essentielle à la réplication virale [Basu et al., 2004; Blight et al., 2000; Lohmann et al., 1999] mais serait plutôt impliquée dans la pathogénicité du virus [Fiorucci et al., 2007].

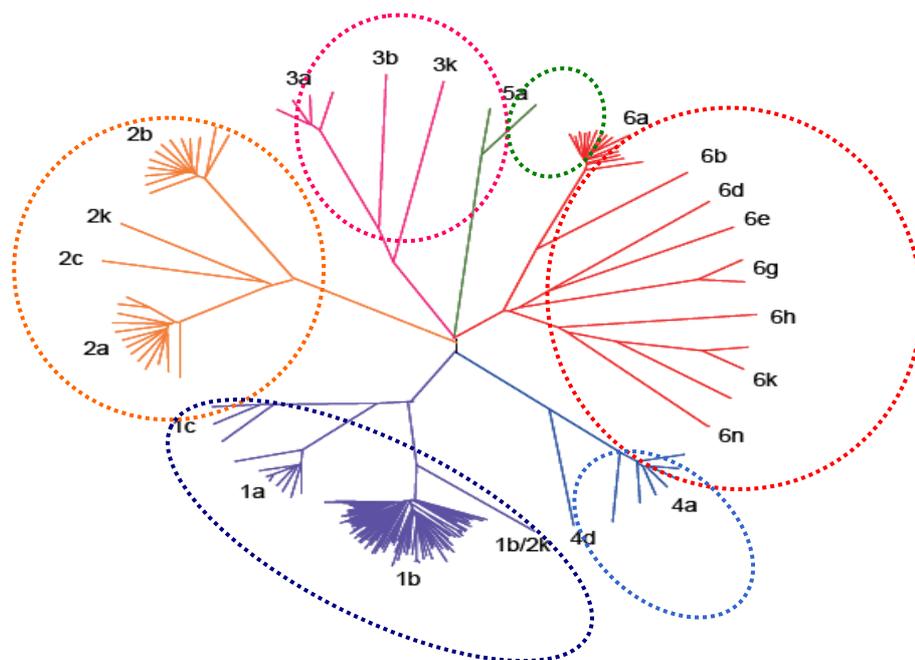
### **2.4. Classification et variabilité du HCV**

#### **2.4.1. Classification des génotypes**

Les génotypes du virus de l'hépatite C sont distingués en fonction du degré d'homologie de séquence entre différents isolats. On parle de génotypes (isolats partageant 65 à 70% d'identité de séquence), de sous-types (isolats d'un même génotype présentant 75 à 80 d'homologie), et de quasi-espèces (plus de 90% d'homologie) [Simmonds, 2004].

Des arbres phylogénétiques ont été modélisés. Plusieurs classifications ont été établies jusqu'à présent, mais n'étaient pas encore uniformisées. Une nomenclature largement inspirée de celle de Simmonds, a été proposée par un groupe d'experts [Simmonds et al., 1994]. Six génotypes majeurs, numérotés de 1 à 6, et de nombreux sous-types, identifiés au sein de chaque type par une lettre minuscule et selon l'ordre de leur découverte (1a, 1b, etc.) ont été identifiés à ce jour (**Figure 10**) [Robertson et al., 1998].

La variabilité génétique du virus de l'hépatite C est très importante et résulte de la coexistence d'une forte réplication virale et de l'absence d'activité 3'-5' exonucléase correctrice [Simmonds, 1995]. Les substitutions s'accumulent au cours des cycles de réplication successifs. Certaines de ces mutations conduisent à des particules défectives car la plupart des mutations survenant au hasard sont létales. Une minorité de ces mutations sont non létales et seront transmises à la descendance. L'accumulation de mutation est retrouvée presque sur la totalité du génome du HCV, mais prédomine au niveau de la protéine d'enveloppe E2/NS1, en particulier au niveau des zones appelées « hypervariables » (HVR) [Simmonds, 1995; Weiner et al., 1991]. Par contre, la région 5'UTR est hautement conservée par les différents isolats.



**Figure 10: Arbre phylogénétique des différents génotypes du virus de l'hépatite C [Timm and Roggendorf, 2007]**

Il existe 6 génotypes majeurs (de 1 à 6) du virus de l'hépatite C (HCV) avec de nombreux sous-types (a, b, c...).

#### **2.4.2. Distribution géographique des génotypes**

Certains génotypes sont largement distribués à travers tous les continents (1a, 1b, 2a/2c, 3a), alors que d'autres, comme les génotypes 4, 5 ou 6, ne sont retrouvés que dans des régions très spécifiques. Ces génotypes utilisés en tant que traceur épidémiologique, peuvent nous renseigner sur les modes de transmission du virus, mais également sur les voies de transmission d'un pays à un autre, ou d'un continent à un autre. La répartition des sous types peut être estimée schématiquement de la façon suivante (**Figure 11**) :

- En Europe, le sous-type 1b est majoritaire en Europe du Nord et du Sud, puis les génotypes 1a, 2a, 2b, 3a sont les plus fréquents avec une répartition variable selon les pays [Cheung, 2000; Dusheiko and Simmonds, 1994; Martinot-Peignoux et al., 1999; Pawlotsky et al., 1995; Reid et al., 1999; Zein and Persing, 1996].
- En Amérique du Nord, les sous-types 1a et 1b sont les plus représentés et en Amérique du Sud, les génotypes 1a, 1b, mais aussi 3a (particulièrement au Brésil) ont été identifiés [Cheung, 2000; Reid et al., 1999].

## BIOLOGIE DU VIRUS DE L'HEPATITE C

- Au Japon et en Chine, le génotype 1b représente respectivement 67 % à 75 % des infections virales C. De très nombreux sous-types du type 3 sont rencontrés en Asie du Sud-Est (Vietnam, Thaïlande, Indonésie) mais le type 1 y est prédominant. Les types intermédiaires, classés dans les types 3 et 6, sont également rencontrés dans ces régions [Tokita et al., 1996; Tokita et al., 1995; Tokita et al., 1994].
- En Afrique, le génotype 4 est fréquemment observé en Égypte et en Afrique centrale, alors que de nouveaux sous-types 1 ou 2 ont été décrits en Afrique de l'Ouest [Jeannel et al., 1998; Mellor et al., 1995; Ruggieri et al., 1996]. En Afrique du Sud, le génotype 5 est le plus souvent observé [Chamberlain et al., 1997; McOmish et al., 1994]. Au Maroc, le génotype 1b est prédominant (47 %) [Benani et al., 1997].

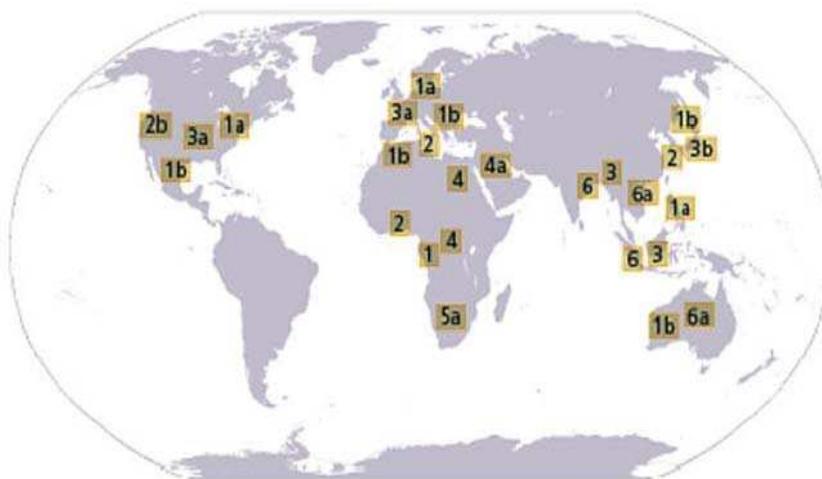


Figure 11: Distribution mondiale des génotypes (1 à 6) du HCV (Source: *Clinical Gastroenterol Hepatol* 3: S97).

### **2.4.3. Conséquences cliniques des génotypes du HCV**

#### **2.4.3.1. Génotype et pathogenèse**

Plusieurs études suggèrent que le génotype 1b serait associé à une atteinte hépatique plus grave (cirrhose avec ou sans hépatocarcinome) [Dusheiko and Simmonds, 1994;

## BIOLOGIE DU VIRUS DE L'HEPATITE C

Nousbaum et al., 1995; Pozzato et al., 1994; Silini et al., 1995]. Cette plus grande gravité pourrait être en partie expliquée par le fait que le sous-type 1b touche les sujets les plus anciennement infectés, soit par transfusion sanguine, soit par un mode de contamination non reconnu. La durée d'évolution de l'infection est également plus longue dans certaines études [Nousbaum et al., 1995; Pol et al., 1995]. Il y a donc des facteurs de confusion potentiels, ce qui incite à interpréter ces données avec prudence.

Dans d'autres études, il n'a pas été montré que le génotype 1b était associé à une maladie plus sévère [Prati et al., 1996; Takada et al., 1993]. De plus, les différents génotypes ont une incidence variable sur le développement de la stéatose [Asselah et al., 2006b]. En l'absence de système de culture cellulaire durable, l'étude du modèle que constitue la transplantation hépatique suggère un effet cytopathogène différent selon les souches virales.

### *2.4.3.2. Génotype et réponse au traitement anti-viral*

Le génotype est le facteur prédictif le plus puissant de la réponse virologique prolongée quel que soit le schéma thérapeutique utilisé (IFN- $\alpha$  avec ou sans ribavirine) [Fried et al., 2002; Lindsay, 2002; Manns et al., 2001; McHutchison et al., 1998; Poynard et al., 1998].

Il a été montré que les sujets infectés par le génotype 1 (particulièrement le sous-type 1b) ont, en Europe comme au Japon, une moins bonne réponse au traitement par interféron alpha par comparaison avec les sujets infectés par les autres types 2a, 2b ou 3a (Martinot-Peignoux et al., 1995; Nousbaum et al., 1995). Lorsque des analyses multivariées ont été effectuées, cette association était indépendante des autres variables de confusion telles que l'âge des malades, la durée de l'infection, ou le mode de contamination [Martinot-Peignoux et al., 1995]. Il a également été montré que la virémie pré-thérapeutique était un facteur prédictif de réponse au traitement anti-viral [Martinot-Peignoux et al., 1995; Nousbaum et al., 1995].

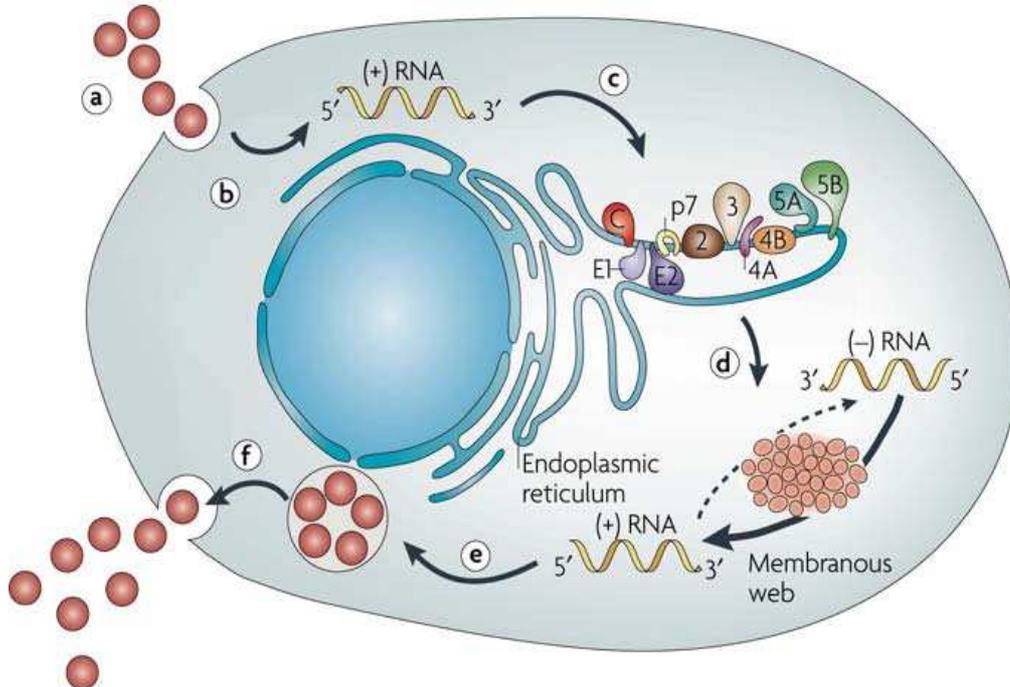
Ces deux facteurs viraux, le génotype et la virémie, étaient indépendamment associés à la réponse. Cependant, les différences de réponse entre les génotypes ne s'expliquaient pas par une différence de charge virale. Cette comparaison s'applique aux souches 1a et

1b vis-à-vis des sous-types 2a, 2b et 3a. Il est vraisemblable que d'autres génotypes soient peu sensibles à l'interféron, comme le type 4 en Egypte et en Afrique équatoriale.

Les mécanismes en cause ne sont pas encore élucidés, mais comme ces données semblent se confirmer, le génotypage associé à l'étude de la charge virale aurait un intérêt clinique en sélectionnant les patients susceptibles de moins bien répondre au traitement pour leur proposer des protocoles thérapeutiques adaptés.

### 2.5. Le Cycle viral

Le cycle viral est constitué de toutes les étapes depuis l'entrée du virus dans la cellule cible jusqu'à la sortie de virions néo-synthétisés. Chaque étape de ce cycle est strictement régulée dans le temps et dans l'espace. L'étude du cycle infectieux du HCV a été limitée pendant longtemps par l'absence de système cellulaire permettant une réplication efficace et de modèles animaux adaptés. Néanmoins, grâce à l'utilisation des différents modèles, et par analogie avec des virus phylogénétiquement proches, nous pouvons établir un schéma général des différentes étapes du cycle viral du HCV (**Figure 12**).



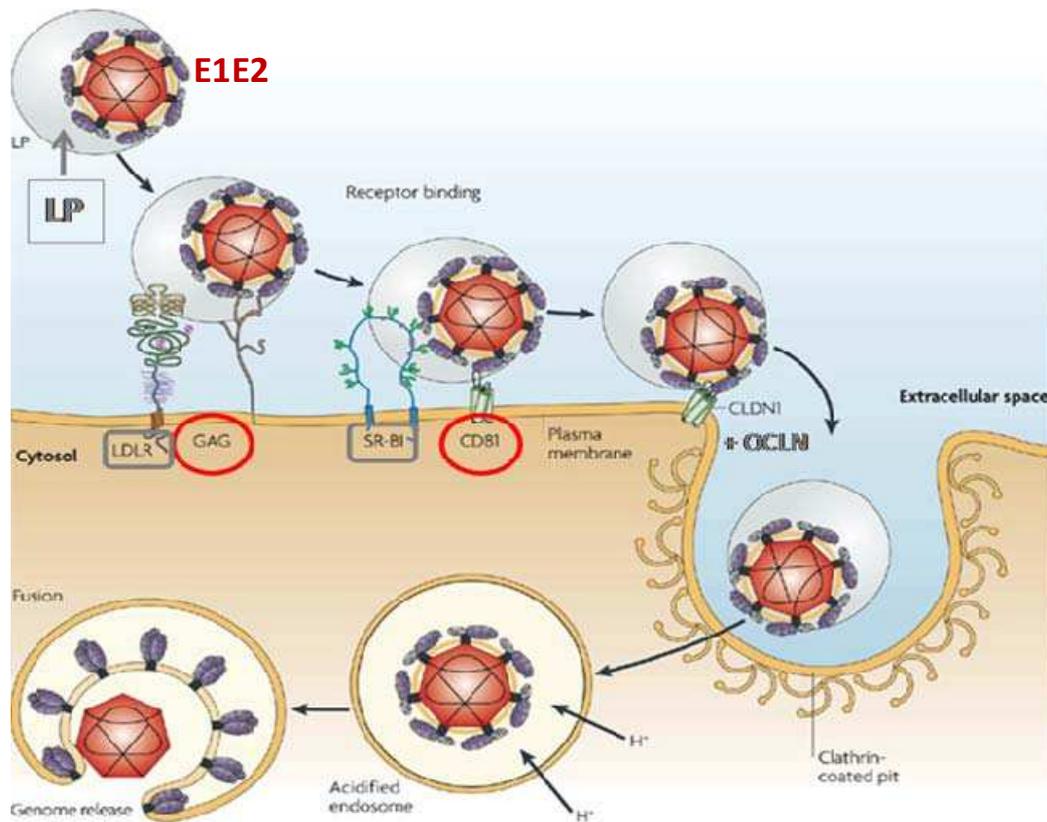
**Figure 12: Représentation schématique du cycle de réplication du HCV [Moradpour et al., 2007].**

Le cycle de réplication du HCV se déroule en plusieurs étapes. Attachement des protéines E1E2 du HCV avec les candidats récepteurs (SR-B1, CD81, LDL-R...) de la cellule cible (a); Décapsidation (b);

Traduction de la polyprotéine (c); Réplication du génome viral (d); Assemblage (e); Maturation et libération des virions (f).

### 2.5.1. Les étapes précoces du cycle viral

Les étapes précoces du cycle infectieux du HCV consistent à l'attachement du virus à la membrane de la cellule hôte qui requiert des interactions spécifiques entre les récepteurs cellulaires et les protéines exprimées à la surface de la particule, suivi de sa pénétration dans la cellule par endocytose et la libération de son matériel génétique dans le cytoplasme (**Figure 13**).



**Figure 13: Modèle de l'entrée du HCV [Moradpour et al., 2007].**

Les particules circulantes HCV peuvent être associées aux lipoprotéines de faible (LDLs) et de très faible (VLDLs). La liaison du virus à la surface cellulaire et l'entrée impliqueraient le récepteur des LDL (LDLR), les Glycosaminoglycanes (GAG), Le récepteur scavenger de type I (SR-BI), la tétraspanine CD81, la Claudine-1 (CLDN1) et l'Occludine (OCLN). La CLDN1 et l'OCLN, protéines de jonctions serrées, joueraient un rôle dans le processus de pénétration de la cellule. L'internalisation dépendrait de l'endocytose clathrine dépendante. L'acidification de l'endosome induirait la fusion membranaire. Peu de choses sont connues sur le processus de décapsidation, qui entraîne la libération du génome dans le cytosol.

2.5.1.1. Attachement et entrée de la particule virale

Afin de pénétrer dans la cellule hôte, le virus doit d'abord se lier à un récepteur. L'interaction spécifique entre le récepteur cellulaire et les protéines d'attachement du virus détermine le tropisme tissulaire.

De nombreuses molécules sont impliquées dans la fixation et l'entrée du virus. D'une part, il a été montré que les deux glycoprotéines d'enveloppe du HCV sont nécessaires à l'entrée virale, mais possèdent des fonctions différentes. La protéine E2 semble plutôt impliquée dans l'adsorption à la surface cellulaire alors que la protéine E1 interviendrait dans la fusion membranaire [Codran et al., 2006; Garry and Dash, 2003; Hsu et al., 2003]. D'autre part, des récepteurs cellulaires ont été découverts grâce à l'utilisation de différents modèles viraux détaillés plus bas. En effet, sept protéines de surface ont été décrites en tant que récepteurs potentiels du HCV. Cette caractérisation avait été basée sur l'affinité qu'avaient ces molécules vis à vis des protéines d'enveloppe recombinantes du HCV.

a ) Le récepteur aux lipoprotéines de faible densité, rLDL

Dans le plasma, les particules virales C semblent être capables de se lier aux lipoprotéines de faible (LDL) et de très faible (VLDL) densité [Thomssen et al., 1992]. C'est pourquoi le récepteur aux LDL (LDL-R) est décrit comme étant un des premiers récepteurs putatifs du HCV [Agnello et al., 1999]. Ainsi, par analogie aux membres des *Flaviviridae*, l'hypothèse d'une entrée du virus dans la cellule par endocytose cellulaire via le LDL-R serait donc possible mais n'a pas pu être démontrée [Agnello et al., 1999; Andre et al., 2002]. Il a été par la suite montré que le LDL-R favoriserait l'infection des hépatocytes primaires par les particules virales dérivées de sérum [Molina et al., 2007]. De plus, une inhibition de l'entrée des HCVcc par les anticorps anti-apolipoprotéine E constituerait un argument supplémentaire d'un rôle de LDL-R dans l'entrée du HCV [Chang, 2009].

b ) Le récepteur scavenger de type I, SR-BI

La protéine SR-B1 (Human Scavenger Receptor class B type 1) est une glycoprotéine de 82 kDa. Cette molécule, fortement exprimée dans le foie et dans les tissus stéroïdogènes,

lie préférentiellement les lipoprotéines de haute densité ou HDL (high density lipoprotein) mais aussi de faible densité ou LDL (low density lipoprotein) [Rhainds et al., 2004; Yamada et al., 2005]. Sa fonction principale est d'assurer le transport spécifique des lipides comme les esters de cholestérol, le cholestérol libre, les HDL et les LDL. Dans le foie, ce récepteur participe à l'apport de cholestérol aux hépatocytes et également à l'efflux du cholestérol hors de la cellule [Zannis et al., 2006].

La reconnaissance de SR-BI par la forme soluble de E2 nécessite la région HVR1 de E2 [Barth et al., 2005a; Bartosch et al., 2003b]. Son rôle dans le processus d'entrée du HCV a été montré en utilisant les HCVpp dans des essais de compétition avec des anticorps polyclonaux anti-SR-BI [Bartosch et al., 2003b; Scarselli et al., 2002]. De plus, il a été montré que, les HDL, ligand principal de SR-BI, faciliteraient l'entrée des HCVpp et HCVcc dans la cellule [Bartosch et al., 2005; Dreux et al., 2006; Voisset et al., 2005]. Ils augmenteraient l'infectivité des HCVpp [Bartosch et al., 2005; Dreux et al., 2006] et des HCVcc lorsque les cellules expriment aussi CD81 [Zeisel et al., 2007]. Par contre, d'autres molécules comme les LDL [von Hahn et al., 2006] inhiberaient l'infectivité des HCVpp via SR-B1. Récemment, une étude a montré que l'interféron était capable de diminuer l'expression de SR-B1 à la surface des cellules et empêcherait ainsi l'attachement et l'entrée du virus dans les hépatocytes [Muraio et al., 2008].

### *c ) Les glycosaminoglycans, GAG*

Les héparanes sulfates (HS) sont des glycosaminoglycans (GAG), très largement distribués dans les tissus, et peuvent être extracellulaires, membranaires ou intracellulaires. Ils sont caractérisés par une très grande hétérogénéité structurale leur permettant d'interagir spécifiquement avec de nombreuses protéines. La présence de charges positives dans la protéine E2 suggère une interaction des protéines d'enveloppe avec les GAG cellulaires [Barth et al., 2003; Barth et al., 2006]. L'utilisation de la protéine E2 recombinante et des HCV-LPs comme ligands, a permis de démontrer que les héparanes sulfates cellulaires (HSPG) jouent un rôle important dans les interactions HCV-cellule cible [Germi et al., 2002].

La liaison du virus aux HS semble être essentielle dans les étapes précoces de l'infection. Cependant, le rôle exact des GAGs dans l'entrée du HCV n'est pas encore bien défini. Plusieurs études ont montré que l'héparine (analogue des HS) et l'héparinase, enzyme

qui clive les HS, inhibent l'étape d'attachement du virus à la cellule et réduit ainsi infectivité [Barth et al., 2006; Basu et al., 2007; Koutsoudakis et al., 2006; Morikawa et al., 2007]. Ainsi la fixation du HCV sur sa cellule cible requière une première étape d'interaction entre la protéine E2 et les HSPG. De ce fait, les héparanes sulfates jouent le rôle de "récepteur d'attachement" pour le virus.

### d) La tétraspanine CD81

CD81 a été proposé comme candidat récepteur du HCV, du fait de la liaison de sa boucle LEL (*large extracellular loop*) avec la protéine recombinante E2 [Pileri et al., 1998]. Cette liaison est spécifique d'une espèce à une autre puisque la sE2 (la protéine E2 recombinante) ne se fixe pas sur CD81 provenant de souris ou de rat [Flint et al., 2006]. CD81 est une protéine membranaire de la famille des tétraspanines avec quatre domaines transmembranaires et deux domaines extracellulaires, SEL et LEL (*small et large extracellular loop*). Elle est exprimée de manière ubiquitaire à la surface des cellules de mammifères (sauf érythrocytes) sous forme de complexes multimoléculaires ou réseau de tétraspanines. La protéine CD81 est associée à des complexes primaires entre tétraspanines ; et des complexes secondaires entre tétraspanines et d'autres molécules. Des études ont montré qu'au niveau des lymphocytes B, CD81 est associée à CD19, CD21 [Fearon and Carter, 1995] et que dans les cellules T, elle s'associe aux récepteurs CD4 et CD8. Cette protéine est impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires tels que : l'adhésion, l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules lymphoïdes [Levy et al., 1998].

Le rôle de CD81 dans l'infection par le HCV a été confirmé par plusieurs approches expérimentales. De plus, il a été observé que des cellules d'hépatomes telles que HepG2 et HH29 (CD81 négatives) sont sensibles à l'infection des HCVcc et HCVpp lorsqu'elles expriment CD81 de manière ectopique [Bartosch et al., 2003b; Cormier et al., 2004; Lavillette et al., 2005b; Zhang et al., 2004]. Des anticorps monoclonaux anti-CD81, mais également la forme soluble de la boucle LEL de CD81, inhibent l'infectivité des HCVpp et des HCVcc *in vitro* [Bartosch et al., 2003b; Cormier et al., 2004; Hsu et al., 2003; Molina et al., 2008; Wakita et al., 2005] et l'infection *in vivo* [Meuleman et al., 2008]. Plusieurs études ont montré que CD81 interviendrait non pas directement dans la fixation du virus mais à une étape ultérieure après l'attachement viral, ce qui laisse entrevoir la

possibilité d'un rôle de cette protéine plus tardivement dans le mécanisme d'entrée [Cormier et al., 2004; Flint et al., 2006; Koutsoudakis et al., 2006].

En somme, CD81 jouerait un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire adaptative via les cellules T et B. Elle contribuerait à la persistance virale, à la pathogénèse et aussi, par activation polyclonale des cellules B, aux manifestations extra-hépatiques observées chez les patients porteurs chroniques [Crotta et al., 2002; Machida et al., 2005; Wack et al., 2001].

Récemment, une étude a montré que EWI-2wint, un partenaire cellulaire de CD81, exprimé à la surface des cellules, bloquerait efficacement l'entrée virale en inhibant l'interaction HCV-CD81 [Rocha-Perugini et al., 2008]. L'absence de cet inhibiteur naturel de CD81 dans les cellules hépatiques permettra ainsi l'entrée du virus et contribuera au tropisme hépatocytaire du HCV. La découverte du rôle de EWI-2wint dans les hépatocytes met en évidence la complexité des mécanismes d'entrée du HCV dans ses cellules cibles et laisse entrevoir de nouvelles approches thérapeutiques.

### *e ) La Claudine*

Les travaux de l'équipe de Evans ont permis d'identifier la claudine 1 (CLDN1), comme étant impliquée dans l'entrée du HCV [Evans et al., 2007]. Cette protéine appartient à la famille des Claudines qui comporte au moins 23 membres. Elle est exprimée dans toutes les cellules épithéliales, plus particulièrement dans le foie, pour former ainsi des jonctions serrées [Furuse et al., 1998]. Les jonctions serrées sont impliquées dans le transport para-cellulaire, dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la polarité cellulaire [Cereijido et al., 1998; D'Atri et al., 2002; Turksen and Troy, 2004]. En effet, l'expression de la CLDN1 dans des cellules d'origine non hépatiques (293T et SW13) permet de les rendre permissives à l'infection par les HCVpp [Evans et al., 2007]. De plus, l'infection des cellules Huh-7 peut être inhibée par mutation de la CLDN1 [Evans et al., 2007]. Néanmoins, une interaction directe entre la CLDN1 et le virus n'a pas été montrée. La CLDN1 a été suggérée comme étant un co-récepteur impliquée dans les étapes tardives de l'infection, après fixation du virus sur CD81 [Evans et al., 2007]. Une étude récente a montré que la distribution de la CLDN1 dans les jonctions serrées corrèle bien avec la permissivité des cellules à l'infection par le HCV [Liu et al., 2009;

Yang et al., 2008], ce qui confirme que la localisation de la CLDN1 dans ces jonctions semble être nécessaire à l'entrée virale et au tropisme cellulaire du HCV.

Deux autres membres de la famille des Claudines, CLDN6 et CLDN9, seraient aussi impliquées dans l'entrée virale [Meertens et al., 2008; Zheng et al., 2007]. Comme pour la CLDN1, elles sont aussi exprimées dans le foie.

*f) L'Occludine*

Il a été montré précédemment que la CLDN1 serait essentiel à l'infection des cellules d'hépatomes, cependant aucune interaction directe entre cette protéine et le virus n'a pu être démontrée. De plus, des cellules de la lignée Hela et HepH (CD81 et SR-B1 positives) qui surexprime la CLDN1, seraient résistantes de l'infection HCV, suggérant ainsi l'implication d'autres facteurs dans les processus d'entrée du virus dans la cellule [Evans et al., 2007].

Très récemment, une étude réalisée par Liu et collaborateurs a permis de mettre en évidence un autre composant des jonctions serrées, associé aux claudines, qui jouerait un rôle important dans la phase d'entrée du virus [Liu et al., 2009]. L'Occludine est une protéine de 60 kDa, essentielle à l'adhérence cellule-cellule dans l'espace paracellulaire [Furuse et al., 1993].

Une diminution de l'expression de la CLDN1 et de l'occludine par des techniques de siRNA et shRNA interférence inhiberait l'entrée des HCVpp et des HCVcc dans la cellule [Liu et al., 2009]. Par microscopie confocale, il a été montré que l'occludine colocalise avec la protéine E2 au niveau du réticulum endoplasmique [Benedicto et al., 2008]. Ces observations suggèrent que l'occludine interagit directement avec E2 afin de faciliter l'entrée de la particule virale à travers les jonctions serrées de la cellule hépatocytaire. Cette étape nécessitera une organisation bien structurée des protéines présentes dans les jonctions serrées.

*g) Les lectines : DC-SIGN et L-SIGN*

Les lectines constituent une autre classe de molécules qui sont impliquées dans la liaison et l'entrée de plusieurs virus. L-SIGN (CD209L), une intégrine impliquée dans

l'adhésion intercellulaire spécifique aux ganglions lymphatiques présents dans le foie ainsi que DC-SIGN, une lectine associée aux membranes, sont aussi des récepteurs présumés pour le HCV. Ces deux lectines ne sont pas les récepteurs spécifiques du HCV, car ils ne sont pas exprimés à la surface des hépatocytes. DC-SIGN est davantage présent sur certaines cellules dendritiques immatures, et on retrouve L-SIGN sur les cellules endothéliales sinusoidales du foie et dans les nœuds lymphatiques [Koppel et al., 2005].

La forme soluble de E2 interagit avec ces molécules avec une forte affinité. Cet attachement résulte de la glycosylation de E2, riche en mannose. L'interaction de E2 aux lectines peut permettre l'établissement ou la persistance de l'infection par le HCV [Gardner et al., 2003; Lozach et al., 2004]. Néanmoins, il a été démontré que L-SIGN et DC-SIGN interagissent avec E2, mais ne sont pas responsables de l'entrée du virus dans les cellules, et permettent seulement l'attachement du HCV aux cellules exprimant ces récepteurs à leur surface.

Un autre membre de la famille des lectines de type C, le récepteur des asialoglycoprotéines [Stockert, 1995] exprimé à la surface des hépatocytes, serait capable de se lier aux HCV-LPs mais son rôle dans l'infection reste à démontrer [Saunier et al., 2003].

### 2.5.1.2. Internalisation de la particule virale

Après attachement à son récepteur, le virus de l'hépatite C se dirige vers les jonctions serrées où il va interagir avec la CLDN1 et l'occludine, pour faciliter son internalisation. Par analogie aux autres *Flavivirus*, l'internalisation du HCV se ferait par endocytose via une vésicule de clathrine. Cette vésicule fusionnerait ultérieurement avec la membrane d'un compartiment endosomal. Ce mécanisme est pH-dépendent avec un pH optimum à 5.5. En effet, l'entrée des HCVpp et HCVcc peut être inhibée par des substances bloquant l'acidification des endosomes précoces [Blanchard et al., 2006; Hsu et al., 2003; Koutsoudakis et al., 2006; Meertens et al., 2006].

Les glycoprotéines d'enveloppe du HCV sont des protéines de fusion de classe II. En effet, les peptides de fusion contenus dans E1 et E2 vont permettre la pénétration des virions enveloppés dans la cellule. Cette étape de fusion entraîne un réarrangement des hétérodimeres E1-E2 et conduit à la formation de pore de fusion [Lavillette et al., 2006].

La fusion de la membrane du HCV avec celles des endosomes permettrait la libération de la nucléocapside. L'ARN génomique serait alors dissocié de la capsid pour servir d'ARN messager permettant la synthèse des protéines virales. Toutefois, l'implication des candidats récepteurs du HCV dans la fusion n'a pas été montrée à ce jour.

### **2.5.2. Traduction et maturation de la polyprotéine**

#### *2.5.2.1. Traduction de la polyprotéine*

La traduction des *Flavivirus* et des *Piconavirus* se fait via un mécanisme coiffe-indépendant, médié par des séquences ARN hautement structurées, appelées IRES, pour lequel l'expression de la protéine virale est régulée par un recrutement direct de ribosomes au niveau du site d'initiation de la traduction [Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wang et al., 1993]. L'IRES, localisé dans la région 5' NC du HCV, permet le positionnement de la sous-unité 40S du ribosome par l'intermédiaire des domaines II et III, directement au contact du codon initiateur inclus dans sa structure. Ce complexe IRES/40S va ensuite recruter le facteur d'initiation de la traduction 3 (eIF3), ainsi que le complexe ternaire 43S (eIF-2/ Met-ARNTi/GTP) [Spahn et al., 2001] pour former un intermédiaire non-canonique 48S, jusqu'à la transition menant à la formation du complexe 80S qui s'accompagne de remaniements de l'IRES [Boehringer et al., 2005; Ji et al., 2004; Otto and Puglisi, 2004]. Le positionnement de l'ARN dans le sillon du ribosome permet ensuite l'assemblage du ribosome 80S fonctionnel qui commence la traduction de la polyprotéine précurseur.

L'activité IRES est modulée par plusieurs facteurs notamment par les protéines cellulaires telles que l'auto-antigène La [Ali et al., 2000; Isoyama et al., 1999], *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L* [Hahm et al., 1998], *pyrimidine tract-binding protein* (PTB) [Ali and Siddiqui, 1995]. La traduction est aussi modulée par des interactions entre les protéines virales et l'IRES. Ainsi, la protéine de capsid diminue l'activité de traduction de l'IRES en se fixant sur son domaine IIIId [Shimoike et al., 2006; Shimoike et al., 1999]. Ces données suggèrent qu'elle est impliquée dans l'inhibition de la traduction afin de favoriser la réplication ou l'encapsidation du génome viral. Pour les

protéines non structurales (NS) du virus, les résultats sont contradictoires. L'équipe de Kato [Kato et al., 2002] a montré que les protéines NS4A et 4B diminuent la traduction IRES-dépendante en contexte cellulaire, alors que d'autres travaux [He et al., 2003] montrent au contraire une stimulation de 2 à 5 fois de l'activité de traduction de l'IRES en présence de ces protéines. A l'opposé, les travaux réalisés par Imbert et collaborateurs [Imbert et al., 2003] ont montré, en contexte cellulaire, l'absence de modulation par les protéines structurales ou non structurales de l'activité traductionnelle de l'IRES.

La région X de l'extrémité 3' non codante du génome viral semble également jouer un rôle régulateur dans la traduction de l'ORF, peut-être par l'intermédiaire de la fixation de la PTB qui faciliterait l'interaction avec la région 5' non codante.

### 2.5.2.2. Maturation de la polyprotéine

La traduction du génome conduit à la synthèse d'une large polyprotéine qui donnera naissance à des protéines matures structurales et non structurales (**Figure 7**). Le clivage de la polyprotéine précurseur est assuré par au moins trois protéases, dont une cellulaire et deux virales [Grakoui et al., 1993b]. Les protéines structurales sont clivées par une peptidase située dans la lumière du réticulum endoplasmique [Dubuisson et al., 1994]. Les protéines non structurales sont clivées par deux protéases virales [Grakoui et al., 1993b; Hijikata et al., 1991], d'une part la protéase NS2-NS3, dotée d'une activité autocatalytique en *cis* permettant le clivage NS2-NS3 [De Francesco et al., 1996; Pieroni et al., 1997], d'autre part la sérine protéase NS3 qui, associée à son co-facteur NS4A, assure le clivage de l'ensemble des jonctions situées en aval [Grakoui et al., 1993b]. Les protéines NS5A et NS5B sont secondairement phosphorylées, et NS5A pourrait subir un clivage ultérieur par une protéase cellulaire libérant un produit doté d'un site de localisation nucléaire et de propriétés d'activateur transcriptionnel [Satoh et al., 2000].

### 2.5.3. Réplication du génome viral

La protéine NS5B avec son activité ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp) et les autres protéines non structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A) s'associent à des

## BIOLOGIE DU VIRUS DE L'HEPATITE C

protéines cellulaires de l'hôte pour former le complexe de réplication (**Figure 14**) [Ishido et al., 1998]. Ce complexe de réplication est associé aux structures membranaires et vésiculaires péri-nucléaires, appelées réseau membranaire (*membranous web*), siège de la réplication [Pietschmann et al., 2001; Rouille et al., 2006]. Cette structure peut être induite par la protéine NS4B seule [Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003]. Plusieurs groupes de chercheurs ont montré que dans les cellules Huh-7 contenant un réplicon subgénomique, la réplication se ferait dans les fractions membranaires [Aizaki and Suzuki, 2004; Miyanari et al., 2003]. Il est admis par la suite que ce réseau membranaire dérive des membranes du RE [Mottola et al., 2002; Pietschmann et al., 2001]. Une fois le complexe de réplication du HCV mis en place dans le réseau membranaire, l'ARN polymérase synthétise un brin d'ARN négatif à partir du génome, qui sert ensuite de matrice pour la synthèse de nombreux brins d'ARN positifs qui seront encapsidés et enveloppés pour devenir les génomes des particules virales néoformées ou serviront de nouveaux messagers pour la synthèse des protéines virales.

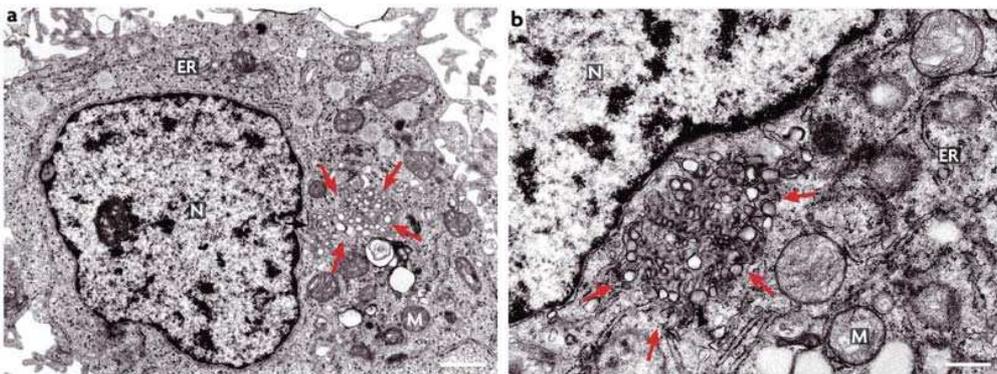
Il a été montré que cette réplication virale est dépendante du métabolisme lipidique. En effet, il existerait une relation entre la réplication de l'ARN et les radeaux lipidiques, microdomaines riches en cholestérol et sphingolipides. Ainsi, des inhibiteurs de la synthèse de novo de sphingolipides ont été montrés capables d'inhiber la réplication, probablement en bloquant l'association des protéines non structurales avec les radeaux lipidiques [Sakamoto et al., 2005; Umehara et al., 2004].

De plus, plusieurs protéines cellulaires capables d'interagir avec la protéine NS5B, telles que la protéine associée aux vésicules associées aux protéines de membranes (VAP-A et VAP-B) [Gao et al., 2004; Hamamoto et al., 2005] la FKBP8 [Okamoto et al., 2006], la FBL2 [Kapadia and Chisari, 2005; Ye et al., 2003], la *growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein* [Tan et al., 1999], la SRCAP [Ghosh et al., 2000], la Karyophérine b3 [Chung et al., 2000], ainsi que la protéine kinase Raf-1 [Burckstummer et al., 2006], ont été identifiées. La protéine VAP-A interagit avec VAP-B via son domaine transmembranaire. Elles sont toutes les deux localisées dans le RE et le Golgi et semblent être essentielles dans la réplication du HCV en interagissant à la fois avec NS5A et NS5B [Hamamoto et al., 2005]. Il a été montré que la protéine FKBP8 et la Hsp90 forment un complexe avec la protéine virale NS5A et que ce complexe jouerait un rôle important dans la réplication du HCV [Okamoto et al., 2006]. Plusieurs études ont

## BIOLOGIE DU VIRUS DE L'HEPATITE C

montré l'importance de la géranylgéranoylation des protéines dans la réplication du HCV [Kapadia and Chisari, 2005]. Une des protéines géranylgéranoylée, la FBL2, impliquée dans la voie de dégradation des protéines, a été identifiée comme interagissant avec la protéine virale NS5A.

D'autres études ont permis d'identifier d'autres facteurs de l'hôte pouvant participer à la réplication du HCV tels que la cyclophiline B [Watashi et al., 2005], la p68 [Goh et al., 2004], la nucléoline [Hirano et al., 2003; Shimakami et al., 2006], et la hnRNP A1 [Kim et al., 2007]. La cyclophiline B, une peptidyl-prolylcis-trans-isomérase, interagit avec la partie C-terminale de la polymérase du HCV pour augmenter son affinité pour l'ARN viral et ainsi contribuer efficacement à la réplication virale [Watashi et al., 2005]. La redistribution de la p68, une ARN hélicase, du noyau au cytoplasme se ferait par sa liaison à NS5B, et cette interaction servirait de médiateur à la réplication [Goh et al., 2004]. Il a été aussi montré que la nucléoline, la phosphoprotéine majoritaire du nucléole, interagirait elle aussi avec la polymérase NS5B et serait essentielle à la réplication du HCV [Shimakami et al., 2006]. La hnRNP A1, une ribonucléoprotéine nucléaire, interagit aussi avec septin 6, ainsi que les 5'-UTR et 3'-UTR de l'ARN du HCV, et contient des éléments agissant en cis nécessaire pour la réplication virale. De ce fait, hnRNP A1 et Septin 6 joueraient un rôle important dans la réplication via des interactions protéine-protéine et protéine-ARN [Kim et al., 2007].

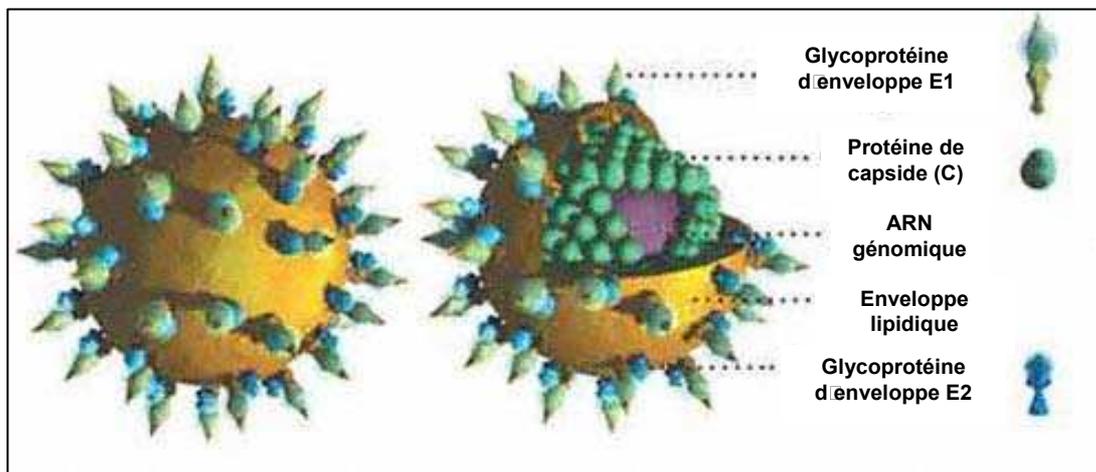


**Figure 14: Complexe de réplication du HCV [Moradpour et al., 2007].**

a) Cellule Huh-7 transfectée par un réplicon sous-génomique du HCV. Une altération membranaire ou membranous web (flèches rouges) est observée. b) Fort grossissement du réseau membranaire, constitué de petites vésicules enchâssées dans une matrice membranaire et associé au RE. Ce réseau contient les protéines non structurales et l'ARN du HCV dans les cellules Huh-7 et représente donc le site de la réplication du virus. ER : le réticulum endoplasmique, M : mitochondries, N : noyau.

**2.5.4. Assemblage et sécrétion des virions néoformés**

L'absence, juste très récemment, de systèmes de culture *in vitro* standardisés, capables de produire des particules virales C infectieuses, a été un frein majeur dans l'étude des étapes ultimes du cycle de réplication du HCV. Cependant, le développement de plusieurs modèles viraux a permis de montrer que la particule HCV mature est constituée, de l'extérieur vers l'intérieur, de 3 structures : (1) une enveloppe lipidique au sein de laquelle sont ancrées deux glycoprotéines d'enveloppe virales, E1 et E2, organisées en complexes hétérodimériques non covalents ; (2) une capsidie protéique formée par la polymérisation de la protéine de capsidie et (3) le génome viral, constitué d'une molécule d'ARN simple brin (**Figure 15**).



**Figure 15: Représentation schématique du virus de l'hépatite C**

*Le virus de l'hépatite C est constitué d'un ARN simple brin, de protéine de capsidie et est entouré d'une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrées les deux glycoprotéines d'enveloppe, E1 et E2.*

Comme pour plusieurs virus à ARN, l'assemblage serait initié par la liaison de la protéine Core à l'ARN viral, qui aboutit à la formation de la nucléocapsidie [Fan et al., 1999]. La liaison à l'ARN et l'oligomérisation de la protéine C sont des fonctions interdépendantes dans l'assemblage [Fan et al., 1999; Shimoike et al., 1999]. La protéine de la capsidie a la propriété d'interagir avec elle-même. Par analogie aux Flavivirus, les nucléocapsides ainsi formés au niveau du cytoplasme pourraient ensuite s'envelopper par bourgeonnement à l'intérieur du réticulum endoplasmique. Les interactions entre la protéine Core et les protéines d'enveloppe E1 et E2 semblent être déterminantes pour la morphogénèse virale. Ainsi, des études de cartographie ont permis de montrer

## BIOLOGIE DU VIRUS DE L'HEPATITE C

l'importance des régions C-terminales de E1 et de Core dans l'interaction des deux protéines structurales [Lo et al., 1995].

Vu la diversité des particules virales C présents dans le sérum des patients infectés, il a été montré que l'assemblage du HCV ne nécessiterait pas obligatoirement d'enveloppe [Klein et al., 2004]. En effet, des nucléocapsides non enveloppées ont été observées dans le cytoplasme d'hépatocytes de patients infectés [Falcon et al., 2003] et dans le sérum de patients infectés [Maillard et al., 2001]. Cependant, le pool de nucléocapsides non enveloppées serait trop faible pour permettre une analyse plus détaillée. De plus, Maillard et collaborateurs ont identifiés un domaine FcγR à la surface des nucléocapsides purifiées du sérum [Maillard et al., 2004]. Ainsi, la nucléocapside pourrait aussi lier plusieurs immunoglobulines (IgG) à sa surface afin d'empêcher sa reconnaissance par le système immunitaire [Namboodiri et al., 2008]. Ce mécanisme de défense pourrait contribuer à la survie du virus dans l'organisme hôte. D'autres études ont montré que la nucléocapside ainsi formée pouvait interagir avec le métabolisme cellulaire des lipides et expliquer la présence dans le sang circulant de particules virales associées aux lipoprotéines, plus infectieuses [Andre et al., 2002].

L'étape de sécrétion des particules néoformées est actuellement mal connue. Toutefois, l'hypothèse d'une sécrétion des virions de la cellule par exocytose est envisageable. Les particules enveloppées suivent les voies de sécrétion de la cellule pour être acheminées à la surface. En effet, les protéines structurales du HCV ont été observées aussi bien au niveau du RE que de l'appareil de Golgi [Serafino et al., 2003]. De plus, les complexes N-glycanes, qui transitent par l'appareil de Golgi, ont été détectés à la surface des particules HCV isolées à partir de sérums de patients infectés [Sato et al., 1993]. D'autre part, des travaux suggèrent que les particules virales du HCV utilisent la voie de sécrétion des LDLs [Huang et al., 2007].

### **3. MODELES D'ETUDE DU HCV**

#### **3.1. Le virus natif dérivé de sérum de patients HCV (+)**

Plusieurs études ont été menées pour caractériser les différentes formes particulières du HCV circulant dans le sérum des patients infectés chroniquement par ce virus. Cependant ces virions sont en quantité relativement faible dans le sérum et présente une hétérogénéité de populations virales dont une partie est complexée avec des lipoprotéines, des immunoglobulines ou autres composants du sérum, rendant leur caractérisation difficile. Ces particules virales ont une densité comprise entre 1,03 et 1,34 g/ml [Andre et al., 2005]. Par ultracentrifugation en gradient de saccharose deux populations virales ont pu être individualisées dans le sérum des patients infectés par le HCV. Une population de haute densité (1,22-1,25 g/ml) correspondant aux virions complets contenant de l'ARN viral, des protéines de capsid et des protéines d'enveloppe E1E2 exprimées à leur surface [Petit et al., 2005]. Ces particules virales ont une taille comprise entre 35 et 70nm [Kaito et al., 1994; Petit et al., 2005]. Une deuxième population de faible densité 1,09-1,10 g/ml a été aussi retrouvée dans le sérum des malades infectés [Miyamoto et al., 1992; Petit et al., 2005; Thomssen et al., 1992; Trestard et al., 1998] et correspond aux Viro-lipo-particles (VLP) [Andre et al., 2002]. Ces VLPs, très infectieuses, sont composées de lipoprotéines riches en triglycérides contenant de l'apolipoprotéine (Apo) B et ApoE, de la nucléocapside virale et les protéines d'enveloppe [Andre et al., 2002; Diaz et al., 2006; Icard et al., 2009; Nielsen et al., 2006] et sont capables d'infecter les chimpanzés [Beach et al., 1992; Bradley et al., 1991]. Vu l'association de ces VLP avec les lipoprotéines, le LDL-R a été montré jouer un rôle important dans l'infection [Agnello et al., 1999; Andre et al., 2002; Bradley et al., 1991; Monazahian et al., 1999]. Cependant, la présence de l'ApoB48, normalement produite par les entérocytes, suggère qu'une partie des VLPs circulantes proviendrait de l'intestin [Diaz et al., 2006].

Des nucléocapsides non enveloppées ont été aussi identifiées dans le sérum des patients infectés. Elles ont une densité de 1.32 à 1.34 g/ml en gradient de césium. Ces particules non enveloppées présentent une hétérogénéité au niveau de la taille avec une

prédominance de 38 à 43nm [Maillard et al., 2001]. D'autre part, des formes circulantes appelées complexes immuns circulants, ont également été retrouvées [Choo et al., 1995; Thomssen et al., 1993]. En effet, ces nucléocapsides, outre leur liaison à des anticorps spécifiques, sont capables d'interagir avec le domaine Fc $\gamma$  des immunoglobulines [Maillard et al., 2004].

### **3.2. Les modèles viraux existants**

#### **3.2.1. La protéine E2 recombinante**

En l'absence de modèles efficaces de réplication *in vitro* du HCV, la forme soluble de la glycoprotéine recombinante E2 (sE2) a été utilisée pour identifier les candidats récepteurs cellulaires impliqués dans l'entrée virale. L'utilisation de sE2 a permis l'identification de deux récepteurs majeurs du HCV : la tétraspanine CD81 [Pileri et al., 1998] et le scavenger récepteur de class B (SR-BI) [Scarselli et al., 2002]. Elle a aussi permis de mettre en évidence l'interaction E2 et les héparanes sulfates (HS) [Barth et al., 2003], l'étude structurale de E2, et la confirmation de son rôle dans l'attachement viral. Cependant, bien que cette approche soit intéressante pour déterminer les potentielles interactions protéine/protéine, elle ne peut pas être utilisée pour étudier les mécanismes de l'entrée virale. En effet, les deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 forment un hétérodimère à la surface de la particule virale et présente donc une structure tri-dimensionnelle. En plus des hépatocytes, la protéine sE2 se lie non spécifiquement à différentes lignées cellulaires d'origine humaine [Barth et al., 2003; Michalak et al., 1997]. Ainsi pour étudier le rôle des glycoprotéines E1 et E2 dans l'entrée du HCV, plusieurs modèles viraux ont été développés.

#### **3.2.2. Les réplicons génomiques/subgénomiques**

L'absence de système de propagation du HCV *in vitro* a considérablement limitée l'étude de la réplication du HCV jusqu'au développement en 1999 d'un système d'ARN sous-génomique, capable de s'auto-réplicuer de façon autonome [Bartenschlager et al., 1994; Bukh and Purcell, 2006]. Le premier réplicon a été construit à partir d'un ARN du

génotype 1b, exprimant le gène de résistance à la néomycine à la place des protéines structurales, et les protéines non-structurales sous la direction de l'IRES de l'encéphalomyocardite (EMCV) [Lohmann et al., 1999]. Après transfection de cet ARN dans la lignée hépatocytaire Huh-7, les colonies possédant la résistance à la néomycine sont ainsi sélectionnées et vont permettre d'établir des cultures de cellules produisant en continu des réplicons subgénomiques. Il a été montré que certaines mutations dans les protéines NS confèrent une meilleure efficacité du réplicon [Blight et al., 2000; Friebe et al., 2001; Guo et al., 2001; Krieger et al., 2001; Lohmann et al., 2001]. Ces mutations ne semblent pas réduire le potentiel cytopathogène du réplicon, ni affecter l'activité enzymatique des protéines NS3 et NS5B. Les réplicons constituent alors un système d'expression des protéines virales très efficace, standardisé, et stable dans le temps. Ils ont permis d'étudier le rôle des protéine NS dans la réplication du HCV et tout particulièrement, le fait que NS2 n'est pas nécessaire à la réplication a pu ainsi être mis en évidence [Lohmann et al., 1999; Tellinghuisen et al., 2007].

Par la suite une amélioration majeure a été apportée à cette structure génétique par l'ajout de séquences codant pour les protéines structurales C, E1, E2, p7, en vue de la production de particules virales complètes et potentiellement infectieuses. Cette approche repose sur l'obtention d'ADNc de l'ARN génomique viral complet à partir de sérums de patients atteints d'hépatite C chronique. En effet, malgré une expression et une glycosylation correcte des protéines structurales, ainsi qu'un fort niveau répliatif de l'ARN viral, ce système de réplicons génomiques ne permet pas de produire des virions infectieux [Blight et al., 2002; Pietschmann et al., 2002].

### **3.2.3. Les particules virus-like ou HCV-LPs**

Le premier modèle viral C a été développé par Baumert en 1998. Les HCV-LPs (*Hepatitis C Virus-like particles*) sont produites dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant codant l'ensemble des protéines structurales du HCV (Core-E1-E2) et une partie de l'IRES [Baumert et al., 1998]. Les protéines produites s'auto-assemblent en particules, mais comme elles ne contiennent pas de génome entier elles ne peuvent pas se répliquer. Ainsi, les particules virales ne sont pas sécrétées, mais seraient plutôt retenues dans des vésicules intracellulaires, ce qui rend leur préparation

difficile. Elles sont par la suite purifiées à partir des lysats cellulaires et possèdent une morphologie et des caractéristiques biophysiques similaires aux virions provenant de patients infectés [Baumert et al., 1999; Wellnitz et al., 2002]. Ces HCV-LPs ont un diamètre de 35 à 49 nm, expriment les protéines structurales (Core, E1 et E2) et sédimentent à une densité comprise entre 1,14 et 1,22g/ml en gradient de saccharose. Un certain nombre d'étude ont été publiées sur l'utilisation de ces particules pour étudier la structure et les fonctions des protéines de capsid et d'enveloppe [Choi et al., 2004; Clayton et al., 2002; Owsianka et al., 2001] ainsi que les interactions HCV-cellule hôte et l'entrée virale, notamment celles avec les cellules dendritiques [Barth et al., 2005b]. Il a été aussi montré que la liaison et l'entrée des HCV-LPs dans la cellule étaient inhibées par des anticorps anti-E1 et anti-E2, démontrant le rôle essentiel des protéines d'enveloppe dans ce processus [Triyatni et al., 2002]. Barth et collaborateurs ont démontré que la liaison entre les glycoprotéines d'enveloppe du HCV et les héparanes sulfates est essentielle pour l'initiation de l'infection virale [Barth et al., 2006].

Cependant, bien qu'E1 et E2 forment un complexe hétérodimérique dans ce système, la glycosylation dans les cellules d'insectes est différente de celle dans les cellules humaines. En effet, la protéine E1 des HCV-LPs présente deux formes glycosylées (33 et 34 kda) alors que chez les mammifères, E1 est mono glycosylé (34kda). En somme, les HCV-LPs restent un modèle pour étudier l'attachement des particules virales à la cellule et non un modèle pour étudier les mécanismes de fusion et de réplication virale puisque ces particules ne sont pas infectieuses.

### **3.2.4. Les pseudo-particules HCV ou HCVpp**

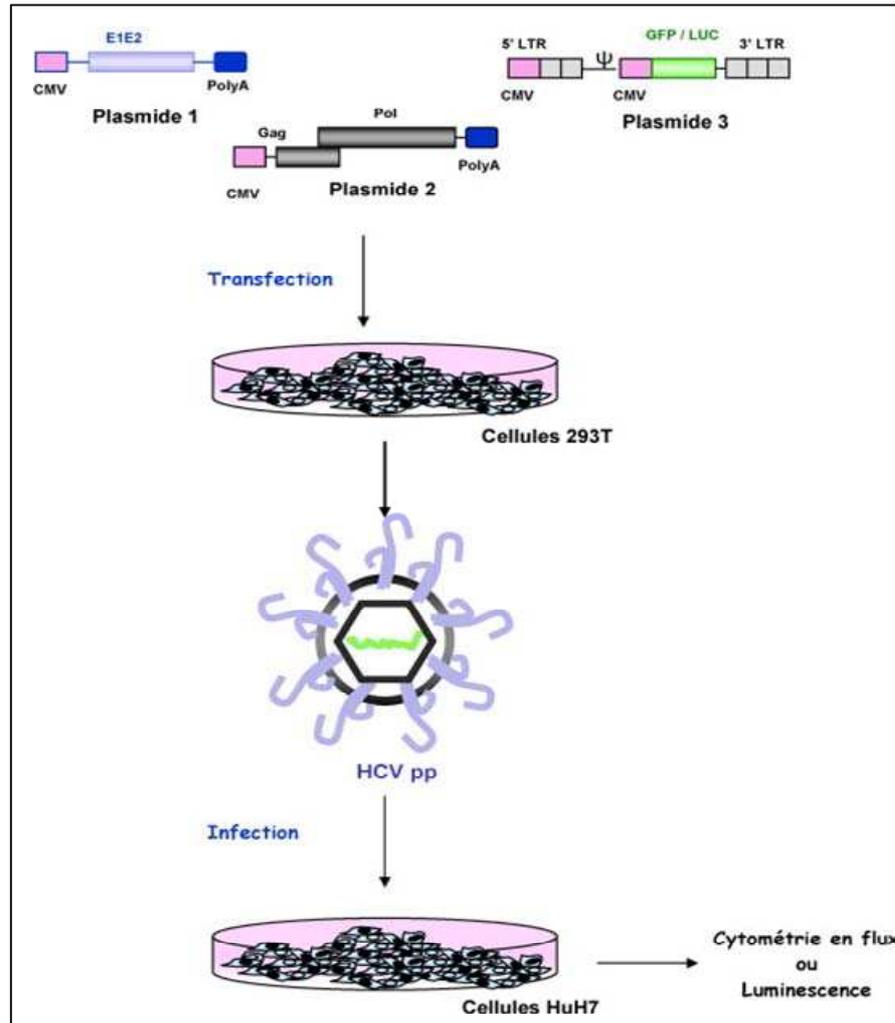
Une autre approche pour étudier l'entrée du HCV a été le développement de pseudotypes. Les pseudo-particules ont été construits en utilisant le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) ou le virus de la grippe (influenza) exprimant les protéines E1 et E2 chimériques [Flint et al., 1999; Lagging et al., 1998; Matsuura et al., 2001]. Ces protéines d'enveloppe ont été modifiées au niveau de leur domaine transmembranaire pour permettre le transport et l'assemblage dans les cellules hôtes. Toutefois, ces modifications affectent la conformation correcte des hétérodimères E1-E2 [Lagging et al., 1998] et pose aussi la question de l'infectiosité de telles particules [Buonocore et al., 2002].

## MODELES D'ETUDE DU HCV

En 2003, Bartosch et collaborateurs ont généré des pseudo-particules basées sur l'utilisation de rétrovirus, le MLV (*Mouse leukemia Virus*) [Bartosch et al., 2003a]. En effet, les rétrovirus sont bien connus pour leurs capacités à incorporer dans leur enveloppe une variété de glycoprotéines cellulaires et virales [Ott, 1997; Sandrin et al., 2002]. De plus, ils peuvent facilement emballer et intégrer des marqueurs génétiques dans l'ADN des cellules hôtes [Negre and Cosset, 2002]. Les pseudo-particules rétrovirales ou HCVpp (*Hepatitis C Virus pseudo-particles*) sont ainsi produites après transfection de cellules 293T avec trois vecteurs d'expression codant pour les protéines E1/E2 du HCV, les protéines gag-pol du MLV et un vecteur compétant pour l'encapsidation et contenant le gène marqueur, la GFP (*green fluorescent protein*) (**Figure 16**). Ces HCVpp expriment des complexes protéiques E1E2 fonctionnelles et sont capables d'infecter des hépatocytes humains ainsi que des cellules de différentes lignées hépatocytaires, Huh-7, HepG2 et Hep3B [Bartosch et al., 2003a; Hsu et al., 2003]. L'infection de ces cellules (particulièrement Huh-7) avec les HCVpp a été utilisée pour étudier l'étape d'entrée virale et les données ont confirmé le rôle de CD81 dans ce processus [Bartosch et al., 2003a; Bartosch et al., 2003b; Hsu et al., 2003; Lavillette et al., 2005a; McKeating et al., 2004; Zhang et al., 2004]. Ainsi, la protéine E1 du HCV a été montré être impliquée dans la fusion, tandis que E2 se fixe sur les récepteurs cellulaires, tels que CD81 et SR-BI. Trois sites putatifs d'interaction avec CD81 ont été identifiés dans E2 regroupant les régions 474-492, 522-551 et 612-619, essentielles pour l'entrée du virus [Rothwangl et al., 2008]. Ce modèle Huh-7/HCVpp a également été utilisée pour évaluer l'activité neutralisante des anticorps présents dans le sérum de patients infectés. Il a été montré que l'entrée des HCVpp était inhibée par des anticorps anti-E2 et du sérum humain [Bartosch et al., 2003a; Keck et al., 2008; Logvinoff et al., 2004].

Cependant, le principal inconvénient de ce système est qu'il ne permet que l'étude des étapes très précoces de l'entrée virale, de la fixation de la particule virale à la libération de la capsid.

## MODELES D'ETUDE DU HCV



**Figure 16: Système des pseudoparticules rétrovirales HCVpp [Bartosch et al., 2003a].**

Les HCVpp sont produites en transfectant trois plasmides : le plasmide 1 exprime les glycoprotéines d'enveloppe E1E2 du HCV, le plasmide 2 exprime la protéine de capsid d'un rétrovirus, le plasmide 3 exprime un génome rétroviral déficient portant un marqueur de transfert : la Green Fluorescent Protein (GFP) ou la luciférase (LUC). Les HCVpp infectent les lignées hépatocytaires (Huh-7) et l'infectiosité est mesurée par cytométrie en flux (GFP) ou par luminescence (LUC).

### **3.2.5. Le système de propagation du virus en culture cellulaire, HCVcc**

En 2005, le développement du premier modèle *in vitro* capable de reproduire l'ensemble du cycle viral et de produire des particules virales infectieuses *in vitro* et *in vivo* a été une avancée majeure dans l'étude du virus de l'hépatite C (**Figure 17**). Ce modèle repose

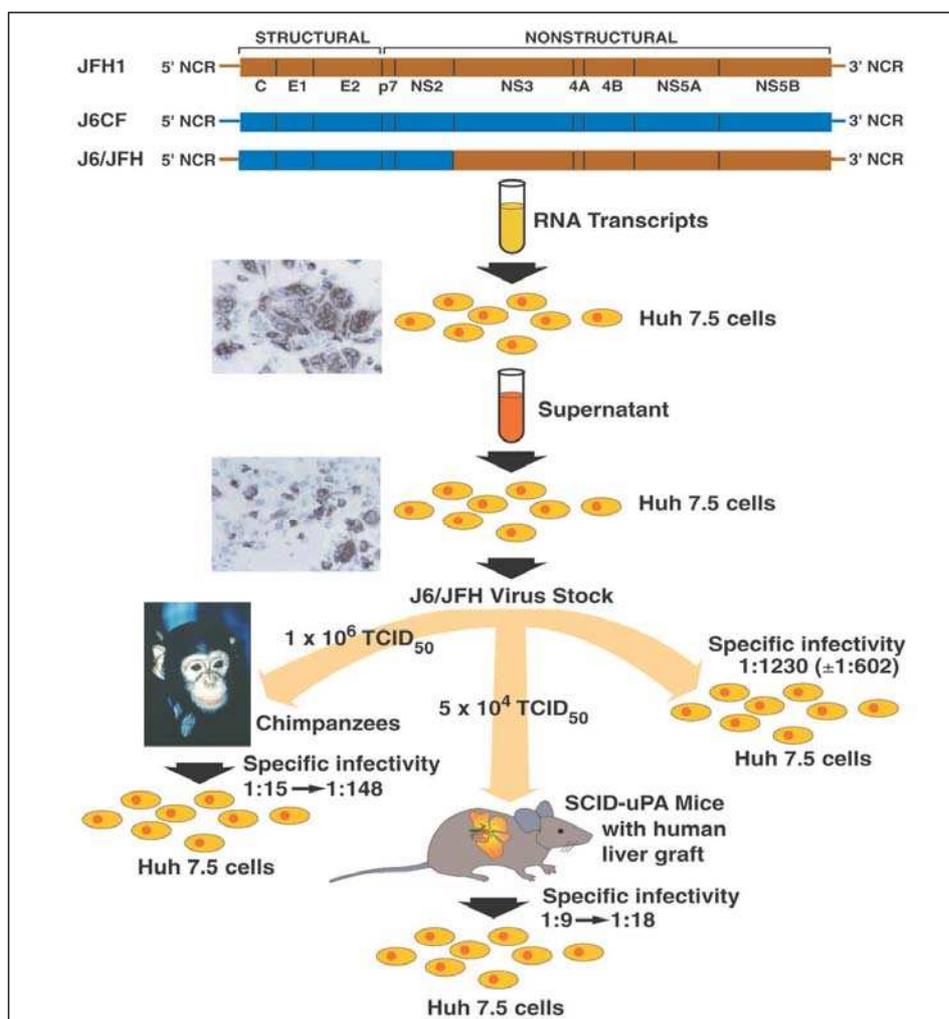
## MODELES D'ETUDE DU HCV

sur l'utilisation d'un réplicon génomique JFH-1 (*japanese fulminant hepatitis*) de génotype 2a, isolé à partir d'un patient atteint d'une hépatite C fulminante (Kato et al., 2001). Cette souche a la particularité de se répliquer efficacement dans les cellules d'hépatome Huh 7 et de produire des particules virales infectieuses sans avoir besoin de mutations adaptatives [Date et al., 2004; Kato et al., 2003; Wakita et al., 2005]. Une étude réalisée par Lindenbach a montré que les clones dérivés de cellules Huh-7 (Huh7.5 et Huh7.5.1) permettaient d'augmenter la production de virions infectieux [Lindenbach et al., 2005]. Les virions ainsi produits (environ  $10^5$  unités infectieuses/ml en 48h de culture) présentent une morphologie sphérique de 60 nm de diamètre et sédimentent à une densité d'environ 1,15g/ml en gradient de saccharose [Wakita et al., 2005]. En plus de leur capacité à infecter les cellules Huh-7 naïves, les virions produits *in vitro* sont infectieux chez le chimpanzé [Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005] et la souris SCID-uPA, un modèle animal principalement utilisé pour l'évaluation de composés antiviraux [Meuleman and Leroux-Roels, 2008; Meuleman et al., 2005]. La réplication virale dans ce système a été montrée inhibée par l'IFN- $\alpha$  [Lindenbach et al., 2005].

Toutefois, ce modèle présente quelques limitations importantes. Ainsi, la production de HCVcc serait limitée d'une part à l'utilisation exclusive de deux lignées cellulaires défectives pour le métabolisme des lipoprotéines (Huh-7 et LH86) et d'autre part à la restriction au génotype 2a. Aujourd'hui, des réplicons chimériques ont été construits à partir de la séquence codant les protéines structurales des différents génotypes (1a, 1b,...) et de la séquence JFH-1 codant les protéines non structurales de génotype 2a [Pietschmann et al., 2006]. Ces constructions vont permettre d'étudier l'influence des protéines structurales de différents génotypes dans la synthèse de particules virales infectieuses et d'augmenter le titre infectieux. A l'heure actuelle, la construction la plus efficace, en terme de titre infectieux est la chimère 2a/2a, formée entre les souches J6 et JFH-1 [Pietschmann et al., 2006] mais elle se modifie rapidement après un passage en culture cellulaire.

Malgré un titre viral faible permettant de caractériser les particules virales produites, le modèle des HCV-cc constitue à l'heure actuelle un outil pour étudier les étapes du cycle viral du HCV afin de développer de nouvelles drogues.

## MODELES D'ETUDE DU HCV



**Figure 17 : Génération de virions J6 et JFH1 en culture cellulaire et démonstration de leur pouvoir infectieux in vivo [Bukh and Purcell, 2006].**

Ce schéma représente l'étude menée par Lindenbach et collaborateurs (Lindenbach et al. 2006). L'ARN transcrit à partir du génome du virus chimérique (J6/JFH-1) est transfecté dans les cellules Huh-7.5. Le surnageant des cellules transfectées est filtré et est utilisé pour infecter des cellules Huh-7.5 naïves. Un immunomarquage réalisé à l'aide d'un anticorps spécifique de la protéine NS5A est montré (Lindenbach et al. 2005). Des virus issus d'un stock viral titré a été inoculé à des chimpanzés (par voie intraveineuse) et à des souris SCID-uPA humanisées (voir C.III.3). Le plasma d'une des souris a permis la réinfection d'une souris naïve. L'infectivité des sérums des chimpanzés et des souris a été déterminée sur des cellules Huh-7 naïves.

### **3.3. Les modèles cellulaires**

Parallèlement à ces modèles viraux, différents modèles cellulaires ont été développés pour étudier le HCV. La réplication du génome du HCV se produit principalement dans les hépatocytes. Cependant, d'autres types cellulaires se sont révélés être permissifs au

HCV, mais de façon moindre, tels que les cellules mononucléées du sang périphérique ou PBMC [Cribier et al., 1995; Lerat et al., 1996], les cellules biliaires [Loriot et al., 1999] et les entérocytes [Deforges et al., 2004]. Ainsi, plusieurs modèles cellulaires combinant des cellules d'origines diverses ont été développés ces dernières années et constituent des outils précieux pour étudier la biologie du HCV et tester de nouvelles molécules antivirales.

### **3.3.1. Lignées cellulaires pour l'étude du HCV**

Différentes lignées humaines ont été optimisées pour permettre la réplication du HCV, notamment celles d'origine hépatique telles que les cellules HepG2, Huh-7, PH5CH et celles d'origine lymphocytaire, les cellules MOLT-4, MT-2 et Daudi.

Parmi les lignées d'origine lymphoïde, les cellules MT-2 (lignée lymphocytaire T humaine infectée par le HTLV-1) sont capables de répliquer le virus [Mizutani et al., 1996]. Les cellules Daudi, d'origine lymphocytaire B, semblent être également de bons candidats en étant capables de répliquer le HCV [Nakajima et al., 1996]. Il a également été montré que le surnageant de cellules Daudi infectées par le HCV pouvait être utilisé pour inoculer des chimpanzés, malgré un pouvoir infectieux relativement faible [Shimizu et al., 1998].

Les cellules PH5CH, immortalisées à l'aide de l'antigène T du SV40 [Ikeda et al., 1998; Noguchi and Hirohashi, 1996] expriment certains marqueurs d'hépatocytes et sont susceptibles à l'infection avec des particules virales provenant de sérum de patients chroniquement infectés par le HCV. Toutefois, la production de particules virales dans ces cellules hépatocytaires immortalisées semble être transitoire. De plus, l'infection de ces cellules activait à la fois la voie de signalisation de l'interféron et une réponse autophagique [Ait-Goughoulte et al., 2008; Kanda et al., 2006; Kanda et al., 2007].

Les cellules d'hépatomes humains (dont les cellules Huh-7) ont été un outil indispensable pour l'étude des différentes étapes de la réplication du HCV. En 2002, des lignées particulièrement permissives, les Huh-7.5.1, ont été mises au point en traitant des cellules hébergeant un réplicon sous génomique du HCV par l'interféron  $\alpha$  [Blight et al., 2002; Zhong et al., 2005]. Ces réplicons sous génomiques ont permis d'étudier le rôle des protéines non structurales dans la réplication du HCV. Par la suite, le réplicon

génomique JFH1 de génotype 2a, s'est révélé répliquer efficacement en Huh-7 sans avoir besoin de mutations adaptatives [Kato et al., 2003]. Plusieurs groupes ont montrés une production de particules HCVcc infectieuses dans le milieu extracellulaire après transfection de l'ARN génomique total du JFH1 (2a) ou des chimères intra-génomique ou inter-génomique (construction avec protéines structurales / protéines non structurales) tels que J6 (2a) / JFH1, H77 (1a) / JFH1 ou S52 (3a) / JFH1 dans les cellules dérivées des Huh-7, notamment les Huh-7.5 [Gottwein et al., 2007; Lindenbach et al., 2005; Lindenbach et al., 2006; Pietschmann et al., 2006; Rouille et al., 2006; Wakita et al., 2005; Yi et al., 2006; Zhong et al., 2005]. Ces particules ont été montrées être infectieuses pour les cellules Huh-7 ainsi que *in vivo* pour les chimpanzés. Cependant, un problème majeur est rencontré avec les cultures de cellules d'hépatomes (HepG2, Hep3B et Huh-7) au niveau de la réponse IFN au poly (IC) et au virus notamment dans les différentes lignées Huh7 provenant de différents laboratoires [Keskinen et al., 1999; Lanford et al., 2003; Li et al., 2005a; Li et al., 2005b]. Les voies de signalisation du TLR3 et de RIG-1 ont été démontrées comme étant défectives respectivement dans les cellules Huh7 [Lanford et al., 2003; Preiss et al., 2008] et dans les cellules Huh7.5 [Sumpter et al., 2005]. Il est probable que ces déficiences constituent un inconvénient au niveau de la permissivité élevée des cellules Huh-7.5 pour la réplication du HCV. De plus, l'infection des cellules Huh-7 avec du JFH1, semble être limitée par l'utilisation de cellule non différenciée, qui ne correspond pas aux conditions cellulaires rencontrées par le virus *in vivo* [Decaens et al., 2009; Moradpour et al., 2007]. Il a été récemment suggéré que la polarité des hépatocytes serait important pour l'entrée du virus du fait des interactions entre le HCV et les protéines des jonctions serrées, la claudine-1 et l'occludine, essentielles à l'absorption virale. En effet, de récentes études suggèrent que la polarité des hépatocytes peut limiter l'entrée du HCV [Mee et al., 2008; Mee et al., 2009]. Face à ces limitations, il est nécessaire de développer de nouveaux systèmes cellulaires plus proches de l'infection *in vivo*.

### **3.3.2. Culture d'hépatocytes humains foetaux (HFH)**

Les cultures d'hépatocytes humains foetaux ont été utilisées pour étudier l'infection par le HCV [Carloni et al., 1993; Iacovacci et al., 1997]. Pour cela, les hépatocytes humains foetaux ont été cultivés dans un milieu sans sérum et inoculés avec du HCV sérique.

## MODELES D'ETUDE DU HCV

L'ARN viral ainsi que les protéines virales ont été détectés dans ces hépatocytes. Plus récemment, Lazaro et collaborateurs ont caractérisés des hépatocytes non transformés provenant de foie foetal humain [Lazaro et al., 2007] et pouvant supportés une réplication virale après transfection de ces cellules avec de l'ARN total de génotype 1a ou après infection avec des particules HCV sériques de génotypes diverses. L'analyse des hépatocytes soit transfectés ou infectés révèle la présence d'ARN du HCV à  $10^6$  copies/ml avec un schéma cyclique et des particules virales qui sédiment à 1,17 g/ml en gradient de saccharose. De plus, il a été noté qu'une réinfection serait possible à partir d'hépatocytes transfectés et que l'IFN inhiberait cette infection. La mort cellulaire observée dans les hépatocytes infectés suggère que le virus entraîne des effets cytotoxiques dans ce modèle. Cependant, les auteurs n'ont pas pu établir si cette mort cellulaire est associée au taux d'HCV présent dans le milieu.

### **3.3.3. Culture primaires d'hépatocytes humains (PHH)**

Différentes sources de tissu hépatique, provenant de donneurs d'organes, de cadavres, d'hépatectomies thérapeutiques ou de biopsies chirurgicales, peuvent être utilisées pour préparer les cultures primaires d'hépatocytes humains [Ballet et al., 1984]. Ces cultures primaires sont préparées par perfusion à la collagénase de ces fragments de foie. Dans des conditions de culture appropriée, ces cellules pourront être maintenues pendant des semaines tout en préservant plusieurs marqueurs phénotypiques hépatocytaires tels que la production de protéines du plasma, de facteurs de coagulation du sang, de l'urée, l'expression de systèmes de détoxication (cytochromes P450, les enzymes de conjugaison, les transporteurs membranaires), la réponse aux stimuli physiopathologiques par activation des voies de signalisation, etc [Guguen-Guillouzo et al., 1986; Guillouzo, 1998; Hewitt et al., 2007; Pichard-Garcia et al., 2002]. En 1996, Ito et collaborateurs ont été les premiers à démontrer que les hépatocytes isolés chez un patient HCV positif, pourrait être cultivé et continué à produire de manière stable des virions infectieux dans leur milieu extracellulaire [Ito et al., 1996]. Par la suite, l'équipe de Fournier a démontrée que des hépatocytes isolés de patients non infectés étaient sensibles à l'infection par le virus HCV sérique et permissives à la réplication du génome viral [Fournier et al., 1998]. Depuis lors, plusieurs groupes ont confirmé ces résultats. Et malgré les performances de ces modèles de culture primaire variant d'un laboratoire à

## MODELES D'ETUDE DU HCV

un autre, en fonction des conditions de culture cellulaire, les résultats indiqués sont cohérents et reproductibles. L'infection des hépatocytes primaires humains avec particules virales sériques de géotypes différents (de 1 à 5) a été évaluée par la détection de l'ARN viral, l'augmentation de l'accumulation intracellulaire de l'ARN génomique, la production de virions infectieux, la génération de quasi-espèce, et l'inhibition de la réplication par l'IFN [Buck, 2008; Carriere et al., 2007; Castet et al., 2002; Chong et al., 2006; Fournier et al., 1998; Molina et al., 2007; Molina et al., 2008; Raymond et al., 2009; Rumin et al., 1999]. Les cultures primaires d'hépatocytes humains hautement différenciés infectés par le virus sérique représentent actuellement le modèle cellulaire le plus proche de la situation physiologique. D'autres études ont montré que ces hépatocytes primaires humains seraient sensibles aux HCVpp [Codran et al., 2006; Meertens et al., 2008; Regeard et al., 2008] et aux HCVcc [Molina et al., 2008; Reynolds et al., 2008]. Ils ont été récemment utilisés pour évaluer comparativement le transcriptome induit par la protéine de capsid, NS3 et NS5A par infection avec un adénovirus [Budhu et al., 2007]. Toutefois, l'efficacité de ces systèmes d'infection des cultures primaires semble être influencée par différents paramètres difficiles à contrôler, comme le pouvoir infectieux du sérum de malade servant d'inoculum, la présence d'anticorps neutralisants anti-HCV dans le sérum et la qualité de préparation des hépatocytes.

Ce modèle de cultures primaires d'hépatocytes présente quelques inconvénients majeurs. L'obtention et l'utilisation de tissus humains requièrent des autorisations nécessaires des organismes de réglementation et le consentement des donneurs. De plus, la qualité du tissu est variable d'un échantillon de foie à un autre en raison de l'état de santé du donneur, de la nature de la lésion, du pré-traitement chirurgical ou à la durée du transport. Par conséquent, les cultures primaires d'hépatocytes humains devraient être utilisées pour confirmer, infirmer ou compléter les données obtenues dans les autres systèmes plus artificiels décrits ci-dessus.

### **3.4. Les modèles animaux**

#### **3.4.1. Le chimpanzé (*Pan troglodytes*)**

Durant des décennies, le chimpanzé (**Figure 18**) a été utilisé pour étudier la biologie ainsi que les candidats thérapeutiques à la fois pour l'infection par le virus de l'hépatite B, HBV [Prince and Brotman, 2001] et pour le HCV [Bukh, 2004]. Actuellement, il représente le principal modèle animal pour l'infection par le HCV. Ce modèle a permis non seulement de caractériser, d'identifier et de cloner le HCV, mais aussi d'obtenir des informations importantes sur la physiopathologie de cette infection virale [Choo et al., 1989].

L'avantage principal de ce modèle repose sur la facilité d'analyser les différentes étapes de la maladie. Il existe très peu de données sur les étapes précoces de l'infection par le VHC chez l'homme, du fait que la phase aiguë de l'infection est majoritairement asymptomatique et n'est souvent pas perceptible. Ainsi, l'inoculation expérimentale des chimpanzés permet d'étudier les phases précoces de l'infection virale. La clairance virale s'observe chez environ 60% des animaux infectés [Bassett et al., 1998]. De nombreuses études ont été réalisées pour mieux comprendre les phénomènes impliqués dans la clairance ou la persistance virale à la phase précoce de l'infection dans ce modèle. Ces études ont montré l'importance de la réponse immunitaire humorale, de la réponse cellulaire et de la variabilité génétique du HCV dans l'élimination ou, au contraire, la persistance virale [Farci et al., 1992; Farci et al., 1995; Farci et al., 1996]. De plus, des expériences chez le chimpanzé ont montré qu'il n'y avait pas d'immunité protectrice de la réexposition virale [Bassett et al., 2001; Farci et al., 1992; Weiner et al., 2001]. Enfin, ce modèle chimpanzé a permis d'identifier certains éléments viraux pour l'infectiosité du virus. En effet, l'importance des sites actifs des enzymes virales, comme ceux des protéases, de l'hélicase et de la polymérase a été réaffirmée [Kolykhalov et al., 2000]. Avec le développement du système cellulaire permettant la production de particule virale, il a été montré que le chimpanzé peut être infecté par les virions produits en culture cellulaire [Wakita et al., 2005].

## MODELES D'ETUDE DU HCV

Néanmoins, ce modèle présente quelques limitations importantes puisque les chimpanzés infectés par le HCV développent rarement une maladie chronique comparativement aux personnes infectées par le virus [Bassett et al., 1998], ce qui rend ce modèle moins approprié pour étudier les mécanismes de la pathogenèse du HCV. De plus, les chimpanzés sont coûteux, difficiles à manipuler et moins disponibles puisque depuis 1988, cet animal a été inscrit comme espèce en danger [Oates, 2006]. Les autres primates comme le cynomolgus, le singe vert, le singe japonais, tamarins et les babouins ne semblent pas être permissifs de l'infection par le HCV [Abe et al., 1993; Garson et al., 1997; Sithebe et al., 2002]. Face à toutes ces limitations sur le modèle chimpanzé, des modèles animaux alternatifs ont été développés pour la recherche sur le HCV.



*Figure 18: Pan troglodytes*

### **3.4.2. Tupaia (Tupaia belangeri)**

Le *Tupaia belangeri* a été proposé, par la suite, comme modèle alternatif au chimpanzé pour étudier le HCV [Xie et al., 1998] (**Figure 19**). C'est un petit animal génétiquement proche des primates. Des essais d'infection réalisés sur le tupaïa semblent indiquer que celui-ci peut être infecté *in vivo* par le HCV [Xie et al., 1998] ainsi que les hépatocytes primaires de Tupaïa [Zhao et al., 2002]. Ces dernières permettent une production de

## MODELES D'ETUDE DU HCV

particules virales infectieuses *in vitro*, et ont été utilisées pour étudier les récepteurs du HCV.

Cependant, toutes ces infections *in vivo* et en culture d'hépatocytes primaires, ne sont que transitoires et les difficultés de reproduction en laboratoire de ces animaux limitent l'utilisation de ce modèle animal.



*Figure 19: Tupaia belangeri*

### **3.4.3. La Souris**

#### *3.4.3.1. Modèle de souris transgéniques*

Le développement d'animaux transgéniques, permettant d'insérer ou de modifier des gènes exogènes, a été un avancé majeur dans l'analyse *in vivo* des gènes de fonction [Bockamp et al., 2002]. Un certain nombre de modèles de souris transgéniques, exprimant les protéines du HCV soit individuellement ou ensemble, a été développé pour d'étudier l'effet de ces protéines et comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions entre le virus et sa cellule hôte. Des études basées sur la souris transgénique ont montrées que la protéine de capsid du HCV serait suffisante pour induire une accumulation de lipides [Kremsdorf and Brezillon, 2007]. De plus, dans une étude récente cette même protéine de capsid a été montré capable de

## MODELES D'ETUDE DU HCV

s'associer aux gouttelettes lipidiques pour jouer un rôle important dans la morphogénèse et la production de particules virales [Miyanari et al., 2007; Shavinskaya et al., 2007]. Il a été également suggéré que cette protéine de capsid présenterait une activité oncogénique dans le foie avec le développement de carcinome hépatocellulaire chez ces souris transgéniques. Une augmentation du risque de cancer a été observée chez les souris transgéniques exprimant la polyprotéine complète du HCV suggérant ainsi le rôle important de ces protéines virales dans la carcinogénèse [Lerat et al., 2002].

Les souris transgéniques ont considérablement contribuées à une bonne compréhension des interactions *in vivo* entre le HCV et son hôte. Toutefois, puisque la souris n'est pas permissive à l'infection HCV, tous les résultats obtenus dans le modèle des souris transgéniques ne seront pas directement applicables à l'infection *in vivo*. Pour contourner cette limitation, des souris transgéniques chimériques, repeuplées avec des hépatocytes humains, ont été développées.

### 3.4.3.2. Modèle de souris humanisées

Deux modèles de xénogreffes pour étudier le HCV ont été élaborés et sont actuellement utilisés pour comprendre la biologie du HCV et évaluer ainsi les thérapies anti-HCV. Ces deux modèles reposent sur la transplantation d'hépatocytes humains chez la souris et la repopulation du foie de la souris.

Le premier modèle utilise des souris transgéniques Alb-uPA, qui surexpriment l'«*urokinase plasminogen activator*» (uPA), un transgène sous le contrôle du promoteur de l'albumine du foie [Heckel et al., 1990]. Mercer et collaborateurs ont croisé des souris transgéniques pour la molécule uPA, souffrant d'atteinte hépatique sévère, avec des souris SCID immunodéficientes, pour générer des souris transgéniques SCID/Alb-uPA [Lindenbach et al., 2005; Mercer et al., 2001; Meuleman et al., 2005]. Dans ce modèle, les souris transgéniques sont transplantées avec une millions d'hépatocytes humains, et la prise de greffe a lieu au cours de 4-6 semaines (**Figure 20**). Ensuite du sérum infecté provenant de donneurs humains est inoculé aux souris. La réplication virale est détectée après 35 semaines chez ces animaux avec des titres viraux compris entre  $10^4$  et  $10^6$  copies/ml. De plus, la réplication a été confirmée par le passage du virus aux trois générations de souris, au cours de laquelle les niveaux d'ARN viral ont été augmentés de

## MODELES D'ETUDE DU HCV

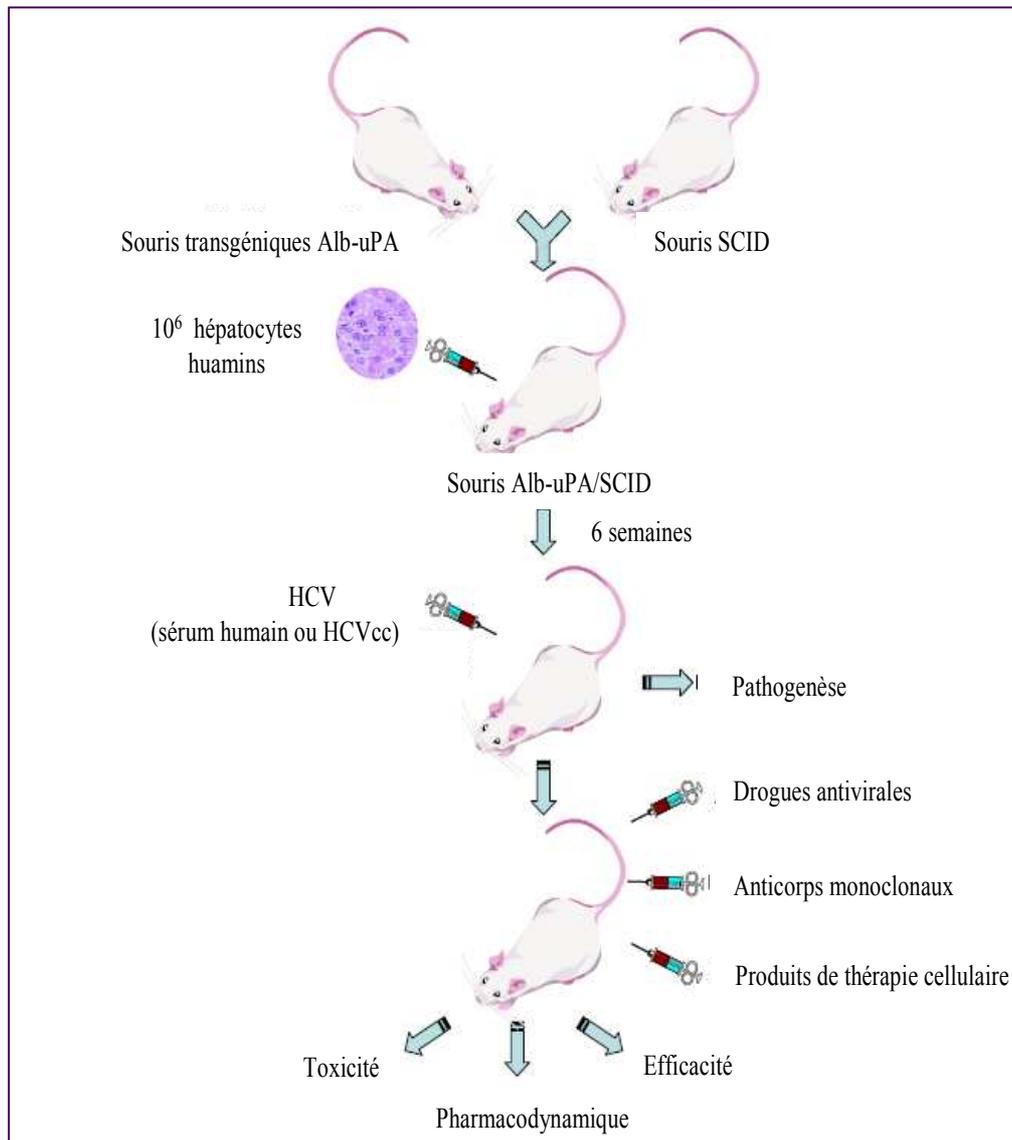
37500 fois. Ces résultats démontrent clairement que la réplication du génome du HCV et la production de particules virales infectieuses est possible dans ce modèle animal. Des études récentes ont montré que le modèle des souris transgéniques SCID/Alb-uPA permettrait d'étudier aussi l'activité antivirale de certaines drogues et l'effet neutralisant *in vivo* des anticorps. Deux publications ont permis d'évaluer l'efficacité de l'interféron alpha2b (IFN $\alpha$ ) et de l'inhibiteur de la protéase NS3 du HCV (BILN2061) sur ces souris. Le traitement à la fois par l'IFN $\alpha$  et le BILN2061 semble produire un effet antiviral similaire chez l'homme et chez la souris SCID/Alb-uPA puisque 4 jours après le traitement avec BILN2061, le titre viral a diminué de 2 log, ce qui a déjà été observé dans les essais cliniques [Kneteman et al., 2006; Vanwolleghem et al., 2007]. Ces résultats indiquent que la souris transgénique SCID/Alb-uPA peut être utilisée comme modèle pour analyser la réponse aux traitements anti-HCV et étudier le métabolisme des médicaments *in vivo* au cours de l'évaluation pré-clinique des candidats thérapeutiques. De plus, ce modèle a été utilisé avec succès pour étudier l'efficacité des anticorps neutralisant l'infection HCV. Law et collaborateurs ont démontré que des anticorps monoclonaux humains seraient capables de neutraliser des particules virales de différents génotypes et confèrent une protection contre des quasi-espèces du HCV [Law et al., 2008]. Enfin, ce modèle de souris SCID/Alb-uPA est intéressant pour plusieurs raisons. D'abord, il est facile d'accès et, par rapport au chimpanzé, présente un moindre coût. Ensuite, il peut servir à évaluer des nouveaux agents antiviraux *in vivo*, et également à identifier des anticorps neutralisants ou encore à étudier la réponse immune contre le HCV.

Un autre modèle de souris a été développé pour étudier la réplication du HCV. Il s'agit de la souris Trimera, obtenue après destruction des cellules du sang suivie d'une reconstitution par la moelle épinière provenant de souris immunodéficientes SCID. Ces souris sont ensuite greffées de cellules hématopoïétiques humaines et de tissus tels que le foie avec 85% de cellules implantées au bout d'un mois [Ilan et al., 2002; Lubin et al., 1991; Lubin et al., 1994]. L'animal qui en résulte est composé de trois tissus génétiquement différents et provenant de diverses sources. Initialement, ces animaux ont été créés pour étudier le développement des cellules B et T humaines, mais elles sont actuellement utilisées pour étudier le HCV. Ilan et collaborateurs ont démontré, par la suite, que la souris Trimera pouvait également être utilisée pour évaluer des

## MODELES D'ETUDE DU HCV

composés présentant une possible activité anti-HCV [Ilan et al., 2002]. Par conséquent, des fragments de foie humain, infectés *ex vivo* avec du sérum HCV positif, ont été transplantés sous la capsule rénale. La virémie reste détectable chez 50% des souris transplantées et pendant un mois avec des charges virales allant jusqu'à  $10^5$  copies/ml. Un inhibiteur de l'IRES du HCV et un anticorps monoclonal dirigé contre la glycoprotéine E2 du HCV ont été montrés capables de réduire de manière sélective la charge virale pendant le traitement. Toutefois, avec des titres viraux faibles et des modifications histologiques observées dans les tissus transplantés telles que l'ischémie, la fibrose et la nécrose, le modèle de la souris Trimera présente de nombreux inconvénients [Galun et al., 1995; Ilan et al., 2002]. L'apparition de ces anomalies histologiques n'est pas surprenant puisque les fragments de foie sont transférés vers une destination extra-hépatique. Par conséquent, les études à long terme visant à évaluer la toxicité hépatique ne sont pas envisageables. De plus, il est impossible d'utiliser ce modèle pour étudier l'entrée virale et sa neutralisation puisque l'infection *in vivo* de souris Trimera transplantées avec hépatocytes humains non infectés n'a pas été réalisé avec succès jusqu'à présent.

## MODELES D'ETUDE DU HCV



**Figure 20 : Modèle de souris chimériques Alb-uPA/SCID pour l'étude du HCV.**

Les souris hétérozygotes Alb-uPA ont été croisées avec des souris homozygotes SCID. Les souris résultant Alb-uPA/SCID peuvent être transplantées avec des hépatocytes humains. Elles peuvent être infectées avec soit du sérum provenant de patient infecté par le HCV, soit avec des particules recombinantes HCVcc. Ce modèle a été utilisé avec succès pour étudier les interactions virus-hôte dans les hépatocytes infectés, ainsi que l'évaluation des stratégies antivirales, y compris les médicaments antiviraux et les anticorps monoclonaux. Dans l'avenir, l'évaluation des produits de thérapie cellulaire représentera une autre application de ce modèle.

## **4. REPONSE IMMUNITAIRE CONTRE LE HCV**

L'éradication de l'infection par le HCV nécessite une interaction complexe et coordonnée entre les réponses immunitaires innée et adaptative, qui en cas d'échec mène à une infection chronique.

### **4.1. Mécanismes de défense de la cellule hôte**

#### **4.1.1. La réponse innée**

C'est la première ligne de défense de l'hôte face à l'infection par le virus de l'hépatite C [Pawlotsky, 2006; Steinman and Hemmi, 2006]. Les cellules participant à cette réponse immunitaire innée correspondent aux monocytes, macrophages, cellules dendritiques, leucocytes, cellules « natural killer » (NK) et les lymphocytes NKT. Elles sont présentes dans le foie et ont la particularité d'exprimer toutes les récepteurs spécifiques aux motifs moléculaires associés à un pathogène ou PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*). Les monocytes, les macrophages et les leucocytes sont des effecteurs et des régulateurs de l'inflammation en raison de leur capacité à reconnaître l'agent pathogène et à produire des radicaux d'oxygène réactif et des cytokines pro et anti-inflammatoires. Les cellules dendritiques sont, quant à elles, des cellules présentatrices d'antigène et des activateurs des lymphocytes T à travers l'expression de molécules de co-stimulation et la production de cytokines [Kaisho and Akira, 2000; Steinman and Hemmi, 2006].

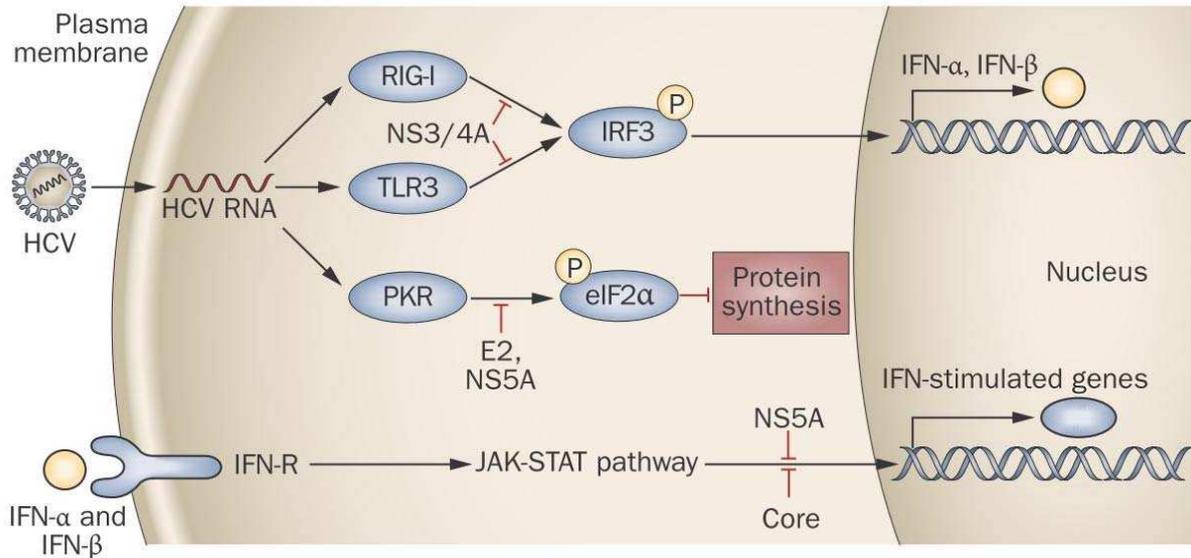
Lors de l'infection par le HCV, différentes voies de défense de la cellule sont activées. Bien que le HCV soit un virus à ARN simple brin, il comporte des régions double brin qui sont reconnues comme des PAMP. Cette reconnaissance conduit à la production d'IFN et déclenche la réponse antivirale de la cellule infectée [Fredericksen et al., 2002; Sumpter et al., 2005]. Dans les hépatocytes, les voies indépendantes du gène inductible par l'acide rétinoïque I (RIG-I) et la voie de signalisation du TLR3 (*Toll Like Receptor 3*) sont les voies principales de la défense antivirale intracellulaire déclenchée par le HCV [Li et al., 2005b; Sumpter et al., 2005; Yoneyama et al., 2002] (**Figure 21**). RIG-1 et TLR-3 activent deux voies différentes. RIG-1, ARN hélicase, est impliquée dans les réponses

## RÉPONSE IMMUNITAIRE CONTRE le HCV

antivirales intracellulaires [Yoneyama et al., 2002]. Elle peut reconnaître des motifs double brin du HCV présents dans les régions 5' et 3' non traduites [Sumpter et al., 2005]. La signalisation liée à ce récepteur dépend des régions homologues à CARD (*caspase recruitment domain*) qui activent IRF-3 (*interferon regulatory factor*) et NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) [Rothenfusser et al., 2005; Saito and Gale, 2008; Yoneyama and Ichida, 2005]. TLR3, également activée par l'ARN double brin, permet l'expression aussi de l'IRF-3 et NF- $\kappa$ B via une protéine adaptatrice appelée TRIF (*Toll-interleukin-1 receptor-domain-containing adaptator inducing INF- $\beta$* ) [Alexopoulou et al., 2001; Yamamoto et al., 2003]. L'activation des voies RIG-1 et TLR3 aboutissent à la phosphorylation d'IRF-3 qui, sous forme de dimère, est transloqué dans le noyau où il va activer ses gènes cibles dont le gène codant l'IFN  $\beta$ . Ceci conduit à la sécrétion d'IFN  $\beta$  par la cellule infectée, sécrétion qui permet l'expression des gènes induits par l'IFN (ISG). Par ailleurs, l'IFN  $\beta$  sécrété agit par voie paracrine et autocrine en se fixant aux récepteurs à l'IFN, qui activent la voie JAK-STAT. Cette voie JAK-STAT aboutit à une seconde vague d'expression des ISG (oligo adénylate synthétase, protéine kinase R ou PKR,...) dans la cellule infectée. La PKR est une protéine kinase cellulaire antivirale mais également un effecteur de la réponse antivirale cellulaire [Delhem et al., 2001]. Un autre ISG, l'IRF-7 est exprimé en réponse à l'IFN. Il est phosphorylé puis interagit avec IRF-3 pour former un hétérodimère qui va activer l'expression de l'IFN- $\alpha$ . L'IFN- $\alpha$  va agir à son tour en diversifiant la gamme des ISG. C'est cette voie IFN- $\alpha$  qui est activée par le traitement actuel du HCV. L'IFN- $\alpha$  induit également la maturation des cellules immunitaires effectrices, ce qui potentialise la production d'autres cytokines pro-inflammatoires, modulant les défenses de la cellule et l'immunité adaptative.

La voie de signalisation de TLR3, importante pour la défense de la cellule face à un virus à ARN, semble être défectueuse dans les cellules Huh7 [Lanford et al., 2003; Preiss et al., 2008]. De plus, les cellules Huh-7.5 qui sont utilisés pour produire des particules HCVcc sont déficientes pour la voie RIG-I du fait de la mutation dans le premier domaine CARD de la protéine [Sumpter et al., 2005].

## RÉPONSE IMMUNITAIRE CONTRE le HCV



**Figure 21: Voies de signalisation de la réponse innée induites par le HCV [Sklan et al., 2009].**

Le HCV interfère avec de nombreux mécanismes de défense de l'hôte, incluant la détection de virus, l'activation de la voie de signalisation de l'IFN et des effecteurs antiviraux. TLR3 et RIG-I sont des récepteurs aux PAMP dont les voies de signalisation en aval, sont bloquées par la protéase du HCV, NS3/4A. Des protéines NS5A et Capside bloque la signalisation de l'IFN via la voie JAK-STAT. E2 et NS5A inhibent à leur tour la PKR, un effecteur antiviral, qui conduit à l'inhibition de la synthèse protéique dans les cellules infectées. Abréviations: IFN, interféron; IRF3, *interferon response factor 3*; PKR, protéine kinase R.

### 4.1.2. La réponse adaptative

Lorsque l'organisme est incapable d'éliminer le HCV malgré l'induction d'une réponse innée non spécifique, la réponse immunitaire spécifique du HCV est par la suite induite pour éliminer le virus résiduel. Cette réponse adaptative est divisée en deux types : des effecteurs cellulaires composés de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et des effecteurs humoraux composés d'anticorps sécrétés par les lymphocytes B activés. La **Figure 22** montre le processus d'induction de cette réponse cellulaire spécifique du HCV. Dans le foie, les antigènes viraux vont être pris en charge par les cellules dendritiques (DC) myéloïdes qui vont migrer vers les ganglions lymphatiques pour les présenter aux cellules effectrices. Au niveau du ganglion lymphatique, les DC matures activent les cellules T *helper* (Th) naïves. L'Interleukine-12 (IL-12) est produite principalement par les DC et va entraîner la différenciation des cellules Th en Th1 qui, à leur tour, vont

## RÉPONSE IMMUNITAIRE CONTRE le HCV

secréter de l'IL-2 et IFN- $\gamma$  pour induire l'activation et la prolifération des CTL et des cellules NK (Cerny et Chisari 1999; Cucchiaroni et al 2000; Valiante et al 2000). Les CTL naïfs pourront reconnaître les antigènes viraux présents à la surface des DC. Une fois ces CTL activés, ils vont migrer des ganglions lymphatiques vers le foie pour ensuite éliminer les hépatocytes infectés grâce à l'expression de molécules HLA de classe I à la surface des cellules. Il a été montré que les CTL spécifiques du HCV jouaient un rôle important dans l'éradication virale, car en plus de l'élimination des cellules infectées, les cellules CD8+ seraient capables d'inhiber la réplication virale [Hakamada et al., 2004; Kaneko et al., 1996]. Dans une autre étude, il a été rapporté que les patients qui avaient éradiqué spontanément le HCV 35 ans plus tôt, présentaient une persistance de la réponse T CD4+ et CD8+ spécifique du HCV [Wertheimer et al., 2003]. De plus, une réponse CD8 vigoureuse et multispécifique est en fait associée à l'éradication de l'infection, aussi bien chez l'animal [Cooper et al., 1999] que chez l'homme [Lechner et al., 2000], et ce particulièrement durant la phase précoce [Gruner et al., 2000]. Cependant, il a été montré que malgré l'existence des réponses CD4+ et CD8+ multispécifiques lors de l'infection virale C aiguë, elles n'empêchent pas l'évolution fréquente vers la chronicité. Ce qui laisse supposer un certain niveau d'inefficacité et/ou d'inhibition de ces réponses.

L'infection par le HCV est aussi à l'origine de la production de très nombreux anticorps, dirigés à la fois contre des épitopes des protéines structurales et non structurales du virus. Le rôle de ces anticorps dans le contrôle de l'infection est mal connu. La production d'anticorps neutralisants est indispensable à la neutralisation des particules virales libres et à l'inhibition de leur pénétration dans les cellules permissives. Lorsque le virus pénètre dans ces cellules, les réponses humorales peuvent contribuer à limiter la transmission virale de cellule à cellule. Leur effet sur les virus intra-cellulaires est lié à la cytotoxicité dépendante du complément et à la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). De nombreux anticorps sont produits au cours de l'hépatite C. Plusieurs études ont montrées que les protéines d'enveloppe (E1 et E2) du HCV sont les cibles majeures des anticorps neutralisants. La région hypervariable 1 (HVR1), située à l'extrémité N-terminale de la région codant la glycoprotéine d'enveloppe 2 (E2) a été proposé comme étant impliquée dans la neutralisation [Farci et al., 1996; Shimizu et al., 1996]. De nombreux arguments plaident

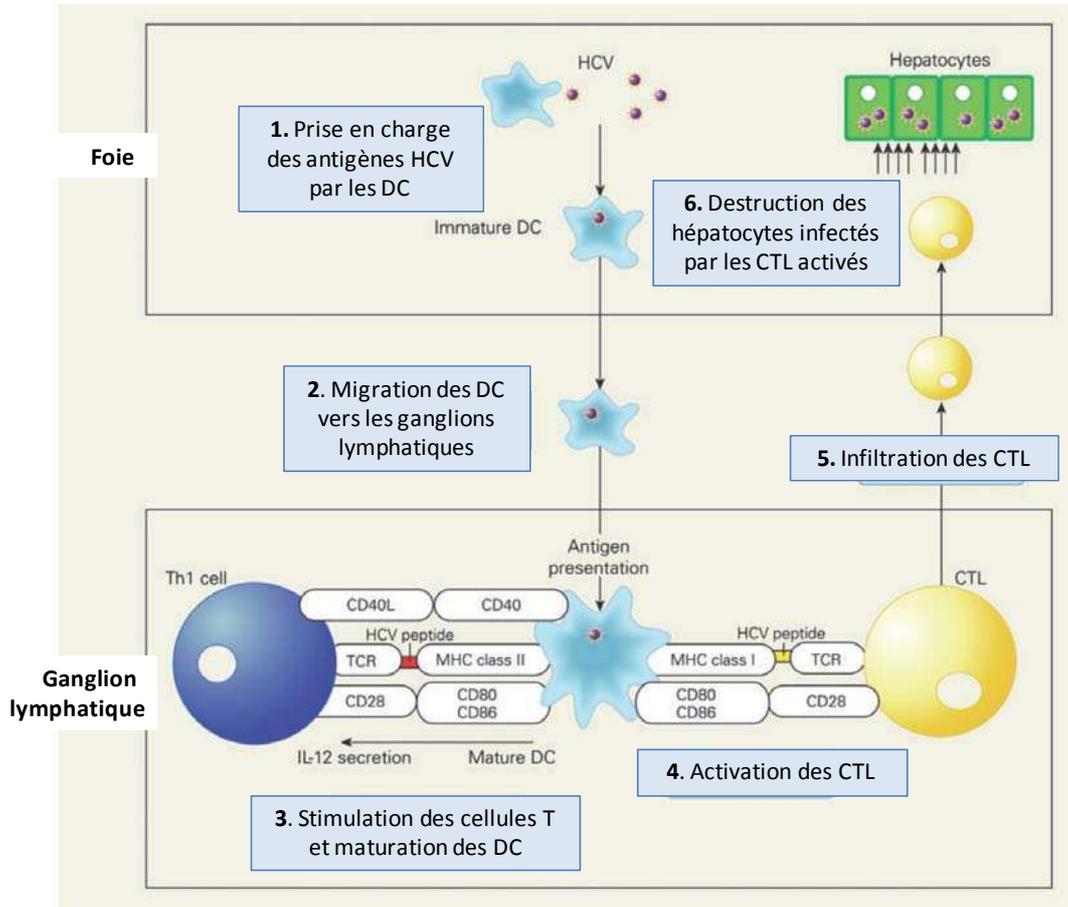
## RÉPONSE IMMUNITAIRE CONTRE le HCV

pour la production d'anticorps neutralisants au cours de l'infection virale C. L'infection *in vitro* de lignées cellulaires lymphoïdes peut être inhibée par l'adjonction de sérum provenant de malades ayant une hépatite chronique C [Shimizu and Yoshikura, 1994]. Des sérums hyperimmuns obtenus après immunisation de lapins avec un peptide HVR1 synthétique peuvent protéger des cultures cellulaires ou des chimpanzés de l'infection par la souche de HCV correspondante [Farci et al., 1996; Shimizu et al., 1996]. Les sérums de patients atteints d'hépatite C aiguë ou chronique contiennent des anticorps capables d'inhiber la fixation des protéines d'enveloppe du virus à des lignées cellulaires *in vitro*, en particulier des lignées d'origine hépatocytaire. Enfin, des anticorps anti-HVR1 peuvent précipiter le HCV, inhiber l'attachement viral et réduire ou inhiber l'infection *in vitro* ou *in vivo* [Farci et al., 1996; Kojima et al., 1994; Shimizu et al., 1996; Zibert et al., 1995]. Cependant, plusieurs observations justifient une réévaluation critique à la fois du rôle de HVR1 dans la persistance de l'infection, mais également du rôle protecteur de ces anticorps. En effet, une transfection intra-hépatique avec de l'ARN viral C complet peut être suivie d'une infection persistante sans induire de mutation dans les gènes structuraux [Bukh et al., 1998]. De plus, la transfection avec un ARN viral présentant une délétion de la région HVR1 peut conduire à une infection résolutive chez le chimpanzé [Forns et al., 2000]. Ces résultats montrent que la région HVR1 n'est pas nécessaire à la progression de l'infection vers la chronicité, ni à l'éradication de l'infection après une hépatite aiguë. Le rôle protecteur des anticorps a été remis en cause puisque les anticorps anti-HCV ne protègent pas de la réinfection des chimpanzés et des individus immunisés [Farci et al., 1992].

Le développement de modèles viraux, tels que les pseudo-particules (HCVpp), et les particules recombinantes (HCVcc), a permis de détecter et de caractériser des anticorps neutralisants dans ces systèmes [Barth et al., 2006; Lavillette et al., 2005b; Pestka et al., 2007; von Hahn et al., 2007; Zeisel et al., 2008]. Récemment, des anticorps humains (HCV1 et 95-2) obtenus après immunisation de souris transgéniques avec la forme soluble de E2 de génotype 1a (H77) ont été caractérisés. Ces anticorps reconnaissent un épitope dans la région E2 (412-423) et semblent être neutralisants dans le système des HCVpp [Broering et al., 2009]. Meunier et collaborateurs ont identifié deux anticorps monoclonaux humains capables de neutraliser spécifiquement les HCVpp de différents génotypes [Meunier et al., 2008]. L'épitope reconnu par ces anticorps a été déterminé et

## RÉPONSE IMMUNITAIRE CONTRE le HCV

correspond à la région de E1 englobant les acides aminés 313-327. Cela supporte donc l'implication non seulement de E2 mais également de E1 dans l'infectivité du HCV.



**Figure 22: Induction de la réponse des cellules T cytotoxiques (CTL) spécifiques du HCV [Hiroishi et al., 2008].**

Après avoir pris en charge les antigènes du HCV dans le foie, les cellules dendritiques myéloïdes (DC) migrent vers le ganglion lymphatique. La DC mature va ensuite activer efficacement les cellules T helper naïfs (Th) en exprimant des HLA de classe II et des molécules de co-stimulation (CD80 et CD86). La stimulation des cellules Th va entraîner l'activation des DC par l'expression du ligand CD40 (CD40L), ainsi que la sécrétion de tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). L'interleukine (IL) -12 produite par les DC myéloïdes va permettre la différenciation des cellules Th en Th1. IL-2 et l'IFN- $\gamma$  sécrétées par les cellules Th1 vont induire l'activation et la prolifération des CTL et des cellules NK. Dans la suite de ce processus, les CTL naïfs vont reconnaître les antigènes du HCV présentés sur le DC. Les cellules CTL activées vont quitter les ganglions lymphatiques pour le foie. Elles peuvent reconnaître les antigènes du HCV exprimés avec les molécules HLA de classe I à la surface des hépatocytes infectés, et entraîner ainsi leur destruction. MHC, complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR, récepteur des cellules T.

## **4.2. Persistance de l'infection virale**

La persistance de l'infection après une hépatite aiguë résulte de l'incapacité des réponses immunes à éliminer efficacement l'infection virale. Les mécanismes exacts par lesquels le HCV échappe à cette réponse immunitaire ne sont pas bien définis. La recherche actuelle met l'accent sur les défauts de fonctionnement à plusieurs niveaux du système immunitaire et l'implication des différents types cellulaires, des cellules présentatrices d'antigène aux cellules effectrices matures.

### **4.2.1. HCV interfère avec la reconnaissance immunitaire innée**

Plusieurs équipes ont suggéré que le HCV pourrait interférer avec l'activation de la réponse immunitaire innée. Les protéines non structurales du HCV, en particulier NS3-4A ont été montrées capables d'interagir avec différentes molécules de l'hôte en vue de perturber les voies d'induction de l'IFN (**Figure 21**). RIG-I, activée par l'ARN viral, se lie à la protéine IPS-1 (*interferon promoter stimulator*, appelée aussi VISA, CARDIF et MAVS) et déclenche une cascade de signalisation qui aboutit à la transcription de l'IFN [Foy et al., 2005; Li et al., 2005a; Meylan et al., 2005]. La protéine IPS-1 est habituellement localisée dans les membranes des mitochondries. La protéase du HCV, NS3-4A a été montré capable de cliver l'IPS-1 entraînant sa délocalisation de la membrane mitochondriale et empêcher ainsi le signal RIG-I [Foy et al., 2005; Li et al., 2005a]. Des échantillons de tissu hépatique provenant de patients infectés par le HCV montrent la délocalisation de l'IPS, ce qui suggère que ce mécanisme est cliniquement relevant [Loo et al., 2006]. NS3-4A a été aussi montré responsable de l'inactivation de la protéine cellulaire TRIF (*Toll-interleukine-1 receptor- domain-containing adaptor inducing IFN*) [Li et al., 2005b]. TRIF est une protéine adaptatrice qui est une composante essentielle de la voie de signalisation TLR3. En clivant IPS-1 et en inactivant TRIF, le HCV perturbe la capacité de la cellule à détecter sa présence. En conséquence, la production d'IFN est diminuée et les défenses de l'hôte sont affaiblies. Cette capacité du virus à échapper à sa détection est d'une importance clinique particulière car il suggère que les inhibiteurs de protéase actuellement en essais cliniques peuvent non seulement bloquer la réplication virale, mais peut aussi stimuler l'immunité.

Le HCV est également capable d'interférer avec les mécanismes de défense spécifique de l'hôte qui sont induits par l'IFN. Le facteur cellulaire PKR bloque la production de protéines dans les cellules infectées. Cette stratégie est un mécanisme cellulaire pour empêcher le détournement de la cellule pour la production de protéines virales. Il a été montré que les deux protéines du HCV, E2 et NS5A, inhibaient la protéine PKR dans des cultures cellulaires [Gale et al., 1997] (**Figure 19**). De plus, la capacité de NS5A à inhiber la PKR semble être spécifique du génotype et pourrait être une des raisons du pourcentage élevé de répondeurs complets observé chez les patients infectés par le génotype 2 [Noguchi et al., 2001].

### **4.2.2. HCV interfère avec l'activation de la réponse adaptative par les cellules du système inné**

#### *4.2.2.1. Inhibition des cellules dendritiques*

Les cellules présentatrices d'antigène, comme les cellules dendritiques, jouent un rôle central dans l'activation du système immunitaire. Plusieurs études suggèrent que le HCV agit dès les premiers stades de l'activation de la réponse adaptative en altérant le fonctionnement des cellules dendritiques. Ainsi, la protéine de capsid et NS3 du HCV altèrent la fonction des DC, qui reconnaissent les protéines du HCV via le TLR2 [Szabo et al., 2003]. Il a été aussi montré que les protéines de capsid et d'enveloppe E1 sont capables d'inhiber la maturation des DC [Sarobe et al., 2003]. De plus, les cellules dendritiques cultivées en présence de peptides du HCV ont une capacité limitée à stimuler les composantes principales de la réponse immunitaire adaptative, les lymphocytes T *helper* (CD4+) et les cellules effectrices (CD8+) [Della Bella et al., 2007]. Ce dysfonctionnement serait lié à une altération du profil de sécrétion des cytokines qui a été observé dans les DC isolées à partir du sang de patients infectés par le HCV. Ceci conduit probablement à une activation défectueuse des cellules T [Della Bella et al., 2007; Tsubouchi et al., 2004]. Les cytokines entraînent la différenciation et la maturation du système immunitaire et une modification dans leur production pourrait entraîner des perturbations. Chez les patients HCV positifs, l'expansion des lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4+ CD25+ par les DC conduit à une modification de la production

## RÉPONSE IMMUNITAIRE CONTRE le HCV

de facteurs humoraux, responsables de la régulation de l'activation des autres cellules T [Dolganiuc et al., 2008].

Cependant, notre compréhension des mécanismes par lesquels le HCV altère les fonctions des cellules dendritiques est incomplète. Des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier les cibles qui peuvent être modifiées pour ainsi restaurer la réponse immune chez les patients infectés par le HCV.

### 4.2.2.2. Les cellules NK

Les cellules *Natural Killer* (NK) constituent une part importante dans la réponse immunitaire innée aux infections virales, mais aussi aux cellules néoplasiques, et participent également à l'amorçage de l'immunité adaptative [Lee et al., 2007]. Les cellules NK sont responsables de la cytolyse perforine dépendante ainsi que de la sécrétion de cytokines et des chimiokines [Lee et al., 2007]. Il a été montré que la protéine E2 du HCV en se fixant à CD81 inhibe la cytotoxicité non spécifique médiée par les cellules NK, ainsi que la production d'IFN- $\gamma$  par les NK [Tseng and Klimpel, 2002]. Ainsi, le HCV peut supprimer directement les fonctions des cellules NK. Toutefois, l'infiltration de cellules NK peut être observée dans le foie des patients après 1 semaine de traitement IFN. La cytotoxicité des cellules NK est alors considérée comme un indicateur de l'efficacité de l'IFN. Plusieurs études ont montrées l'évidence que les cellules NK sont impliquées dans l'élimination du HCV, alors que leur suppression pourrait être impliquée dans la persistance de l'infection. La protéine de capsid du HCV augmente l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I en augmentant l'expression de la protéine TAP1 (*transporter associated with antigen processing*) et de p53 [Herzer et al., 2003]. Par conséquent, la surexpression de CMH de classe I contribue à la persistance de l'infection par la suppression de l'activité cytotoxique des cellules NK. Toutefois, il a été suggéré qu'un inhibiteur du récepteur des cellules NK, KIR2DL3, serait impliqué dans l'éradication du HCV [Ahlenstiel et al., 2009].

**4.2.3. Mécanismes d'échappement à la réponse adaptative**

En plus de se soustraire au système immunitaire inné, le HCV a développé des moyens efficaces pour éviter le système immunitaire adaptatif via deux méthodes : la première est liée à la prédisposition du virus à établir une infection chronique et la seconde est liée à son habilité à limiter les capacités de l'hôte à développer une immunité protectrice [Farci et al., 1992].

*4.2.3.1. Evasion de la réponse humorale par le HCV*

Dans la plupart des infections, les anticorps ont un rôle clé dans l'élimination d'agents pathogènes par la neutralisation virale, l'opsonisation et de la dégradation des antigènes. Le mécanisme le plus fréquemment évoqué pour expliquer la progression de l'infection virale aiguë C vers la chronicité est le contournement de la réponse immune humorale par la sélection de variants viraux non reconnus par les anticorps neutralisants synthétisés par l'hôte (mécanisme d'échappement du virus à la réponse neutralisante). La base moléculaire de l'échappement est le taux élevé de mutations nucléotidiques spontanées survenant au cours de la réplication et l'absence d'activité correctrice de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN. Le taux exact de mutations de la polymérase virale est inconnu. Plusieurs études ont permis d'identifier des résidus critiques au niveau des protéines d'enveloppe du HCV [Farci et al., 1997]. Dans certaines régions, telles que la région hypervariable 1 (HV-R1) située à l'extrémité N-terminale de la région codant pour la glycoprotéine d'enveloppe 2 (E2), ce taux est beaucoup plus élevé. Il a été rapporté que certains anticorps anti-HVR1 peuvent protéger certaines cellules et les chimpanzés de l'infection expérimentale par le HCV [Farci et al., 1996; Shimizu et al., 1996]. Cependant ces anticorps anti-E2 apparaissent plus précocement, plus fréquemment et à un plus haut titre chez les chimpanzés et les individus qui progressent vers la chronicité que chez ceux qui ont une infection résolutive [Bassett et al., 1999; Prince et al., 1999]. Deux observations justifient une réévaluation critique du rôle de la région HVR1 dans la persistance de l'infection liée au HCV. D'une part, une transfection intra-hépatique avec de l'ARN viral C complet peut être suivie d'une infection persistante (jusqu'à une année) sans induire de mutation dans les gènes structuraux [Bukh et al., 1998]. D'autre part, la transfection avec un ARN viral dont la

## RÉPONSE IMMUNITAIRE CONTRE le HCV

région HVR1 a été délétée peut conduire à une infection résolutive chez le chimpanzé [Forns et al., 2000]. Ces résultats montrent que cette région hypervariable n'est pas nécessaire à la progression de la maladie vers la chronicité, ni à l'éradication de l'infection après une hépatite aiguë. Ainsi la production d'anticorps dirigés contre un répertoire élargi d'épitopes viraux pourrait être un objectif.

### 4.2.3.2. Evasion de la réponse cellulaire par le HCV

La fonction des CTL spécifiques du HCV comme effecteurs est fortement réduite durant l'infection chronique. Il a été montré que chez les porteurs chroniques, une diminution d'expression de la chaîne  $\zeta$  de CD3, cruciale pour le fonctionnement des cellules T, est observée sur des lymphocytes périphériques [Maki et al., 2003]. Les réponses CTL sont fonctionnellement déficientes avec une faible production d'IFN- $\gamma$ , de perforine, et une diminution de leur capacité de prolifération et de pouvoir cytotoxique [Missale et al., 2004].

La protéine de capsid du HCV, présente dans les cellules infectées et dans le sang périphérique, inhibe l'activation et la prolifération des cellules T ainsi que la production d'IFN- $\gamma$  par ces cellules T [Kittlesen et al., 2000; Yao et al., 2003]. La protéine NS4A/B bloque l'expression de molécules HLA de classe I à la surface des cellules en inhibant le trafic du réticulum endoplasmique vers le Golgi [Konan et al., 2003]. C'est une des raisons pour lesquelles les CTL ont tendance à ne pas reconnaître les hépatocytes infectés. Tous ces dysfonctionnements peuvent conduire à la persistance de l'infection.

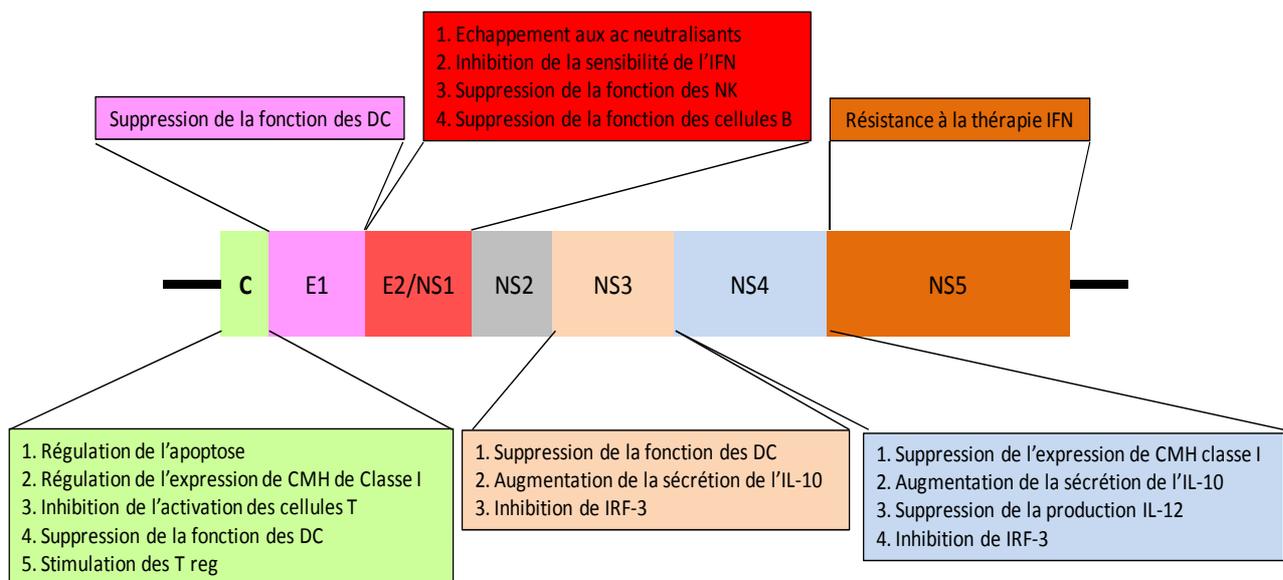
Durant la phase aiguë de l'hépatite C, l'activité cytotoxique des cellules T mémoires CCR7-CD8<sup>+</sup> est altérée. Il a été rapporté que l'IL-2 permettrait aux CTL de compléter leur fonction effectrice [Francavilla et al., 2004]. Par conséquent, un déficit en IL-2 pendant la phase d'activation des cellules T peut être responsable de la différenciation incomplète des CTL mémoires, observée chez des patients présentant une infection aiguë. Il est supposé que la protéine de capsid du HCV supprime l'IL-2 et la transcription du gène de son récepteur  $\alpha$  via l'inhibition de la phosphorylation de ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) et de la *mitogen-activated ERK kinase* [Yao et al., 2001]. De plus, l'expression de la protéine PD1 (*programmed cell death 1*), responsable

## RÉPONSE IMMUNITAIRE CONTRE le HCV

de l'inhibition de la fonction effectrice des cellules T, a été montré être activée dans les cellules CD8 spécifiques du HCV durant la phase aiguë de l'infection [Urbani et al., 2006].

La phase chronique est elle caractérisée par la présence de cellules T CD4+ spécifiques du HCV avec une prolifération altérée. La production d'IL-10 et du facteur de croissance TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) est observée. Il a été suggéré que ces phénomènes conduisent à l'infection persistante via l'inhibition de la prolifération et de l'activation des cellules T *helper* et des CTL [Hiroishi et al., 2008].

Dans le foie, d'autres cellules immunitaires, telles que les cellules endothéliales sinusoidales et les cellules de Kupffer, peuvent présenter des antigènes viraux. Cependant, elles expriment quelques molécules de co-stimulation, comme le CD80 et CD86. Ces cellules ne sont donc pas en mesure de stimuler de manière efficace les cellules T et peuvent induire une tolérance immunitaire [Mehal et al., 2001].



**Figure 23: Effets des protéines du HCV sur la réponse immunitaire [Hiroishi et al., 2008]**

Les effets inhibiteurs des différentes protéines du HCV sur les réponses immunitaires de l'hôte ont été reportés. Abréviations : DC, les cellules dendritiques ; IFN, interféron, IL, interleukine ; IRF, interféron regulatory factor ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; NK, natural killer ; Treg, cellules T régulatrices ; ac, anticorps.

### **4.3. La réponse humorale neutralisante**

Les anticorps neutralisants spécifiques d'un virus sont définis comme étant capables de bloquer l'entrée du virus dans les cellules et constituent un moyen de contrôle de la propagation virale. Cette observation s'appuie sur le fait que de nombreux vaccins antiviraux efficaces sont basés sur l'induction d'anticorps neutralisants. Ces anticorps neutralisants peuvent intervenir à différents stades de l'entrée virale, dans les interactions virus/cellule (l'attachement au récepteur, la fixation du virus et la fusion membranaire), ainsi que dans le processus de pénétration. Ainsi, l'isolement et la caractérisation d'anticorps ciblant les différentes étapes d'entrée virale constituent un outil important dans le développement de vaccin contre le HCV.

L'importance de tels anticorps pour la clairance du HCV peut s'expliquer par le fait que 20% des patients infectés par ce virus évoluent vers une guérison spontanée. Leurs cibles sont les protéines d'enveloppe E1 et E2 du HCV empêchant ainsi le virus de se fixer aux cellules cibles [Pinschewer et al., 2004]. Actuellement, la nature et la spécificité des anticorps neutralisant l'infection virale C *in vivo* restent inconnue.

Plusieurs groupes ont utilisé des modèles d'infection du HCV pour étudier l'activité neutralisante des anticorps provenant de patients en phase aiguë ou chronique. L'équipe de Steinmann a développé un modèle basé sur l'utilisation des HCV-LP avec des lignées de cellules d'hépatome, Huh-7 et HepG2 [Steinmann et al., 2004]. Ainsi, la liaison des HCV-LP avec ces cellules a été montré être spécifiquement inhibée de façon dose dépendante par des anticorps présents dans le sérum de patients ayant une hépatite C aiguë ou chronique. Cependant, la présence de ces anticorps n'est pas associée à la clairance virale *in vivo*.

En utilisant le test de neutralisation basé sur les HCVpp, il a été montré que les sérums de patients hémodialysés infectés (génotype 1b) soit inhibent ou augmentent l'infectiosité des HCVpp (E1/E2 génotype 1a ou 1b) [Lavillette et al., 2005b]. L'effet inhibiteur inversement corrélé avec l'ARN du HCV dans le sérum suggère que les anticorps inhibiteurs peuvent être impliqués, au moins en partie, dans le contrôle de la répllication virale *in vivo*. Cependant, en utilisant un système similaire, Meunier et collaborateurs ont observé que la présence de ces anticorps neutralisants n'était pas

## RÉPONSE IMMUNITAIRE CONTRE le HCV

nécessaire à l'élimination virale [Meunier et al., 2005]. D'autre part, une augmentation de l'infectiosité des HCVpp a été observée préférentiellement avec le sérum de patients ou de chimpanzé présentant de titres viraux élevés, ainsi qu'avec le sérum des patients non infectés. L'apolipoprotéine C1, composante des HDL, a été démontré être responsable de cette activation [Meunier et al., 2005]. Owsianka et collaborateurs ont utilisé les HCVpp pour évaluer la réactivité et la capacité de neutralisation des antisérums et des anticorps monoclonaux dirigés contre certaines régions de la protéine E2 du HCV [Owsianka et al., 2005]. L'antisérum de lapin dirigé contre la région HVR1 ou contre l'ectodomaine de E2 présente une neutralisation spécifique mais limitée. Par contre, l'anticorps monoclonal AP33 (reconnaissant les résidus 412-423 de E2, région très conservée entre les différents génotypes) a été montré capable de neutraliser l'infectiosité des HCVpp de différents génotypes. Toutefois, Boo et collaborateurs ont étudié la capacité des anticorps de patients, soumis à un traitement antiviral, à neutraliser les HCVpp [Boo et al., 2007]. Aucune corrélation n'a été observée entre la charge virale initiale, la présence de quasi-espèces, le taux d'anticorps neutralisants et la réponse au traitement IFN-PEG et ribavirine. Plus récemment Haberstroh et collaborateurs en utilisant les HCVpp dans des tests de cinétique et de fusion a montré la présence d'anticorps neutralisants, dans la majorité des individus infectés par le HCV, ciblant les étapes précoces d'entrée virale via l'interaction HCV-CD81, SR-BI et la fusion membranaire [Haberstroh et al., 2008].

Cependant, une séroneutralisation croisée de différents génotypes du HCV a été montrée par l'utilisation d'anticorps, issus de sérums de patients chroniquement infectés, sur des particules lentivirales pseudotypées exprimant les protéines d'enveloppe du HCV (les HCVpp) [Bartosch et al., 2003a; Logvinoff et al., 2004; Meunier et al., 2005]. Ces anticorps sont rares chez les individus qui ont résolu leur infection [Bartosch et al., 2003a; Logvinoff et al., 2004; Meunier et al., 2005], suggérant qu'ils ne sont pas impliqués dans l'éradication de ce virus. La nature et la spécificité des anticorps neutralisants restent donc à déterminer.



## ***CHAPITRE II - OUTILS D'ETUDE***

---



## L'ANTICORPS MONOCLONAL D32.10

Pour étudier le rôle neutralisant de l'anticorps D32.10 *in vitro* et déterminer la signification biologique des anticorps anti-E1E2/D32.10-like *in vivo*, nous avons développé plusieurs techniques basées sur l'utilisation d'outils originaux développés dans notre laboratoire. Les caractéristiques de l'anticorps monoclonal D32.10 (AcMo), des particules HCV sériques et des cellules HepaRG sont décrites ci-dessous.

### **1. L'ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-HCV E1E2/D32.10 (PETIT ET AL., JBC 2003)**

Dans le but d'obtenir plus d'informations sur la nature exacte des interactions entre E1 et E2, Petit et collaborateurs ont produit des anticorps monoclonaux murins dirigés contre les complexes d'enveloppe E1E2, exprimés à la surface des particules HCV naturelles. L'anticorps monoclonal D32.10 a ainsi été obtenu par immunisation de souris avec des particules virales provenant de sérum d'un patient chroniquement infecté (HCV-L, génotype 1b). Ces particules virales ont été isolées à partir de plasmaphérèses d'un patient infecté de manière chronique par le HCV par des étapes successives d'ultracentrifugation [Petit et al., 2003]. Les souris BALB/c ont été ensuite inoculées avec 100 µg de cette préparation virale en 2 injections (correspondant à 10<sup>6</sup> copies d'ARN du HCV) puis stimulées par 50 µg (deux injections) avant la fusion avec des cellules de myélome X63 [Buttin et al., 1978]. Les surnageants provenant de ces cultures d'hybridome, ont été sélectionnés en fonction de la présence d'anticorps spécifiques du HCV.

Les résultats de cette étude ont permis de montrer que l'anticorps anti-E1E2/D32.10 se fixe spécifiquement sur les particules HCV sériques d'origines diverses (sous-types 1a et 1b), avec une grande affinité. L'analyse en western blot en conditions réductrices a montré que le D32.10 réagit fortement avec un doublet à 60-68 kDa et plus faiblement avec un autre doublet à 31-34 kDa, suggérant que l'anticorps reconnaît les protéines d'enveloppe E1 et E2 à différents stades de glycosylation. En effet, il existe de nombreux sites de N-glycosylation dans E1 (6 sites) et E2 (jusqu'à 11 sites) dans tous les isolats connus du HCV de génotypes 1-4 [Okamoto et al., 1992]. En conditions non réductrices, l'AcMo D32.10 reconnaît des protéines de haut poids moléculaire correspondant vraisemblablement aux complexes E1E2 associés de manière covalente (200 kDa).

## PARTICULES VIRALES C DERIVEES DE SERUM DE PATIENTS : HCV<sub>sp</sub>

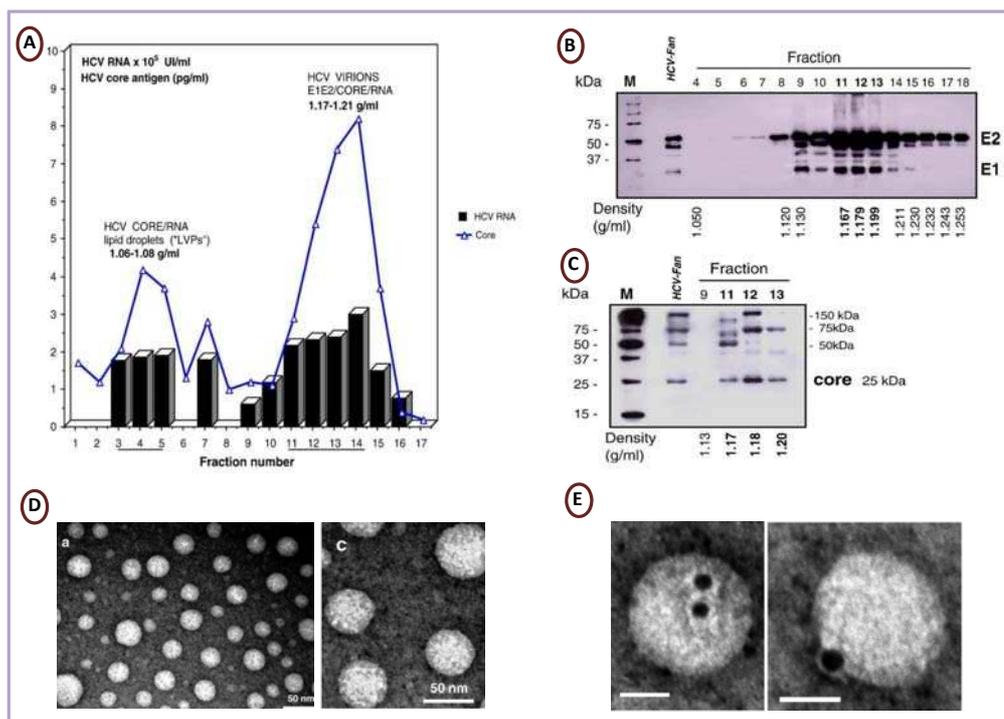
Pour identifier les résidus impliqués dans la reconnaissance avec l'anticorps D32.10, la méthode du phage display a été utilisée. C'est une technique de présentation d'une banque aléatoire de peptides mimant *in vitro* la sélection naturelle de séquences moléculaires nucléotidiques en fonction des propriétés des peptides correspondants. Ainsi plusieurs régions de E1 et E2 ont été sélectionnées puis utilisées dans une approche de SpotsScan afin de tester leur réactivité vis-à-vis du D32.10. Une immunoréactivité a été observée avec les régions suivantes : E1<sup>292</sup>TFSPRRHWTTQGCNC<sup>306</sup>, et E2<sup>480</sup>PDQRPYC**WHY**PPKPC<sup>494</sup>,<sup>608</sup>LVDYPYRL**WHY**PCTI<sup>622</sup>. Les deux régions identifiées dans E2 contiennent le même motif (**WHY**) rapporté par Yagnik [Yagnik et al., 2000] comme étant impliqué dans l'hétérodimérisation de E1E2. Les trois régions identifiées contiennent des résidus cystéine (C), qui pourraient être impliqués dans les ponts disulfures intra et/ou intermoléculaires. Les résidus Cys<sup>306</sup>, Cys<sup>494</sup>, et Cys<sup>620</sup>, situés dans la partie C-terminale de chaque peptide, ont été montrés critiques pour la reconnaissance de l'anticorps par la technique d'AlaScan (substitution des amino-acides par alanine). Enfin, des anticorps de même spécificité que le D32.10 (appelés ici D32.10-like) ont été retrouvés dans le sérum des patients infectés par le HCV.

## **2. LES PARTICULES VIRALES C DERIVEES DU SERUM DE PATIENTS OU HCV<sub>sp</sub> (PETIT ET AL., VIROLOGY 2005)**

En utilisant l'anticorps monoclonal anti-E1E2/D32.10, Petit et collaborateurs ont identifiés puis caractérisés des particules HCV sériques ou HCV<sub>sp</sub> (Petit et al., 2005). Ces particules virales ont été purifiées à partir de plasmaphères de patients atteints d'hépatite C chronique. Le premier patient (HCV-L, génotype 1b) a développé une hépatite C chronique après une transplantation hépatique. Le second patient (HCV-Fan, génotype 1a/2a) présentait aussi une hépatite C chronique mais associée à une cryoglobulinémie de type II avec une vascularite cutanée sévère qui nécessite des échanges plasmatiques [Henrard et al., 1998], permettant ainsi de purifier les particules HCV à partir de grands volumes. La purification des particules HCV a été réalisée par des étapes successives d'ultracentrifugation permettant ainsi de concentrer le matériel viral.

## PARTICULES VIRALES C DERIVEES DE SERUM DE PATIENTS : HCVsp

L'analyse des différentes populations virales par sédimentation sur gradient de saccharose montre la présence de deux sous-populations bien distinctes (**Figure 24**). Une première population virale qui sédimente à une densité comprise entre 1,06-1,08 g/ml correspondant aux particules associées aux lipoprotéines (LVP pour *Lipo-Viro-Particles*), décrits par André [André et al., 2002]. Une seconde population virale avec une densité comprise entre 1,17-1,21 g/ml correspondant aux virions complets qui expriment les protéines d'enveloppe E1 et E2 et contiennent l'ARN du HCV et l'antigène de capsid. Une analyse en microscopie électronique (ME), après immunoprécipitation avec l'anticorps anti-E1E2/D32.10 a permis de visualiser les particules exprimant l'épitope D32.10 et de déterminer la taille des particules. Ainsi, ces particules ont un diamètre compris entre 38 et 46 nm. Par une approche d'immunomarquage à l'or en ME, nous avons montré que l'épitope E1 (297-306)-E2 (480 -494) (613-621) reconnu par l'anticorps D32.10 était présent à la surface des HCVsp enveloppés.



**Figure 24: Caractérisation des particules HCV sériques ou HCVsp [Petit et al., 2005].**

(A) Distribution des différentes populations virales en fonction de leur densité. (B) expression des protéines d'enveloppe E1 et E2 par western blot avec l'anticorps D32.10. (C) Expression de la protéine de capsid par western blot. (D) Analyse des HCVsp par microscopie électronique et détermination de la taille des particules virales. (E) Expression de l'épitope E1E2 à la surface des particules HCV sériques.

**3. LES CELLULES PROGENITRICES DU FOIE, HepaRG (GRIPON ET AL., PNAS 2002 ; PARENT ET AL., GASTROENTEROL 2004 ; MAIRE ET AL., BBRC 2008)**

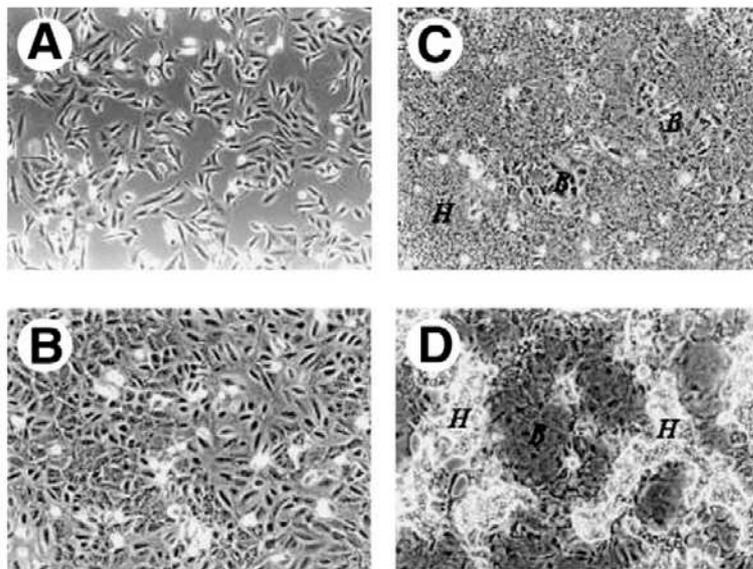
Dans notre laboratoire, une lignée originale, la lignée HepaRG, a été obtenue et caractérisée en collaboration avec l'unité Inserm 522 (C. Guguen-Guillouzo, Rennes). Ces cellules HepaRG ont été isolées à partir d'une tumeur d'Edmonson de grade 1, résultant d'une infection chronique à long terme par le HCV. Cette lignée constitue le premier système d'étude d'un cycle de réplication complet du HBV [Gripou et al., 2002].

L'étude réalisée par R. Parent dans le cadre de sa thèse au sein de notre équipe a permis de caractériser ces cellules HepaRG aussi bien sur le plan phénotypique que morphologique [Parent et al., 2004]. Les résultats ont permis de mettre en évidence le caractère bipotent de ces cellules. Sur un plan morphologique, l'observation en microscopie à contraste de phase à différents stades de culture a permis d'identifier (1) une population homogène de type épithélial non différencié au stade prolifératif qui évolue progressivement vers (2) deux types cellulaires morphologiquement distincts, l'un hépatocytaire (H), l'autre apparenté aux cellules biliaires (B) (**Figure 25**). Sur le plan phénotypique, le profil d'expression des marqueurs de cellules hépatocytaires (cytokératine 18 ou CK18, albumine et HP-1 ou *hepatocyte-specific antigen*), de cellules biliaires (CK19) et de cellules souches (M2-PK, OV1, OV2 et CD34) a été analysé. Tous ces marqueurs sont exprimés dans ces cellules au stade différencié avec une localisation spécifique selon le type cellulaire. Tout au long de la culture, les HepaRG acquièrent progressivement un phénotype hépatocytaire polarisée avec l'expression de CD26, la Cadhérine-E (marqueurs respectifs du pôle apical et latéral), et ZO-1 (un marqueur des jonctions serrées). Enfin l'expression de CK18, CK19 et de marqueurs des cellules ovoides (M2-PK et OV1) dans le tissu hépatique dont sont issues les cellules HepaRG a été analysée. Ces expériences ont clairement montré la co-expression de tous ces marqueurs dans les zones néoductulaires. Cette étude a permis de démontrer que les cellules HepaRG constituent la première lignée de cellules progénitrices hépatiques humaines (CK18, CK19, M2PK et CD34 positives) qui peuvent se différencier en deux types cellulaires (cellules hépatocytaires et biliaires) après 28 jours de culture.

## CELLULES PROGENITRICES DU FOIE : HepaRG

Plusieurs études ont montré la fonctionnalité de ces cellules tant sur le plan métabolique (fer, cytochrome P45) [Aninat et al., 2006; Kanebratt and Andersson, 2008] qu'en terme de réponse immunitaire innée [Maire et al., 2008]. Dans notre équipe, Maire et Parent ont étudié les effets du poly (I:C), un analogue d'ARN bicaténaire, sur l'expression de l'IFN- $\beta$  et des chimiokines ainsi que sur la fonctionnalité de la voie de signalisation de l'IFN- $\alpha$  dans les cellules HepaRG [Maire et al., 2008]. Ces résultats ont montré que la voie de signalisation induite par l'ARN double brin (db) via le TLR3 est fonctionnelle dans les cellules HepaRG, contrairement aux cellules d'hépatome [Lanford et al., 2003]. En effet, l'exposition des cellules HepaRG au poly (I:C) entraîne une induction de l'IFN- $\beta$  capable d'inhiber la réplication du HCV et de certaines chimiokines (CXCL-10, IL-8, CXCL-11) ainsi que de leurs récepteurs.

Ainsi, les cellules HepaRG se révèlent être très intéressantes car elles possèdent des propriétés fonctionnelles voisines des hépatocytes humains normaux (HHN) en cultures primaires, et permettent de retrouver des conditions *in vitro* proches de celles rencontrées *in vivo*



**Figure 25: Cinétique morphologique des cellules HepaRG (Parent et al., 2004).**

Les cellules ont été observées en microscopie en contraste de phase à différentes phases de culture : (A) début de la phase de prolifération (Jour 2), (B) Phase proliférative avancée (Jour 4-5), (C) Phase intermédiaire ou stationnaire (Jour 7-14), et (D) la phase de différenciation (Jour 28-35). Abréviations H, hépatocytes ; B, cellules biliaires (Grossissement x100).

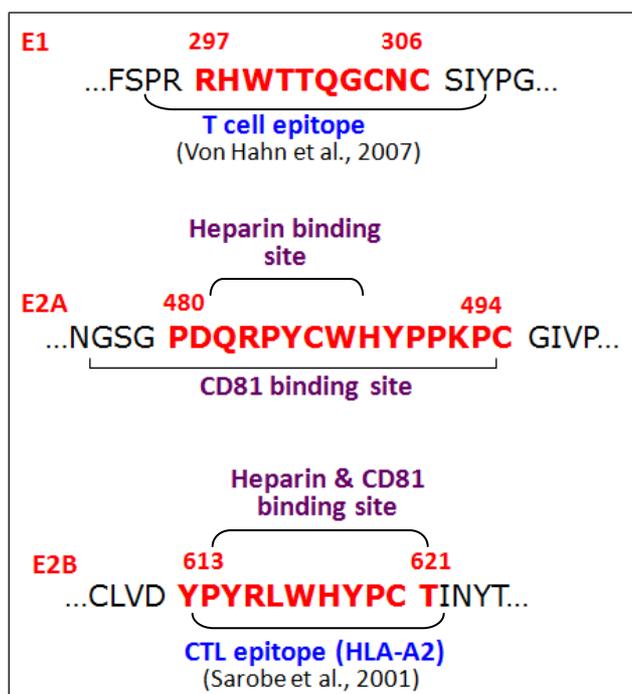
### **4. OBJECTIFS DES TRAVAUX**

L'étude de la réponse humorale neutralisante contre le virus de l'hépatite C a longtemps été difficile du fait de l'absence d'un système complet d'infection avec une réplication virale efficace. Contrairement au HBV, le stigmate de guérison de l'hépatite C est inconnu. Si environ 80% des patients infectés par le HCV évoluent vers la chronicité, jusqu'à présent nous ne savons pas pourquoi ni comment environ 20% guérissent spontanément. Nous supposons la présence d'anticorps capables de neutraliser efficacement l'infection et responsables de la guérison mais leur existence n'a jamais été démontrée, ni a fortiori leur spécificité.

Le développement du modèle des pseudoparticules virales ou HCVpp [Bartosch et al., 2003a], et de celui des virions recombinants infectieux produits en culture cellulaire ou HCVcc [Wakita et al., 2005] a permis de mettre au point de tests de détection des anticorps neutralisants le HCV. Seul le système des HCVcc permet de détecter des anticorps inhibant l'infectiosité des particules lors de la réinfection des cellules. Les anticorps actuellement identifiés dans ces systèmes sont des anticorps dirigés contre la région hypervariable HVR1 de la protéine E2 de l'enveloppe virale et sont présents aussi bien précocement chez les patients évoluant favorablement que tardivement chez les patients porteurs chroniques avec réplication virale active [Bartosch et al., 2005; Lavillette et al., 2005b]. De ce fait, ces anticorps ne sont donc pas discriminatifs d'une évolution vers la guérison ou vers la chronicité.

Durant cette thèse, nous avons essayé de tirer profit des propriétés et des caractéristiques uniques de l'AcMo D32.10 [Petit et al., 2003]. En effet, les trois régions (E1, E2A et E2B) qui constituent son épitope sont hautement conservées entre les différents génotypes du HCV. Il a été montré que les régions E2A et E2B sont impliquées dans des interactions avec des candidats récepteurs du HCV tels que CD81 [Rothwangl et al., 2008] et les GAGs [Olenina et al., 2005] (**Figure 26**). De plus, la région (297-306) de E1 a été montré être une cible de la réponse cellulaire T CD4+ spécifique du virus [von Hahn et al., 2007]. La région E2B est quant à elle un épitope reconnu par les cellules T cytotoxiques, CTL [Sarobe et al., 2001]. Nous avons montré qu'une réponse anticorps de même spécificité que le D32.10 pourrait être détectée chez des patients infectés par le HCV.

### Epitope D32.10 (Petit et al., JBC 2003)



**Figure 26: Importance fonctionnelle & structurale de l'épitope D32.10**

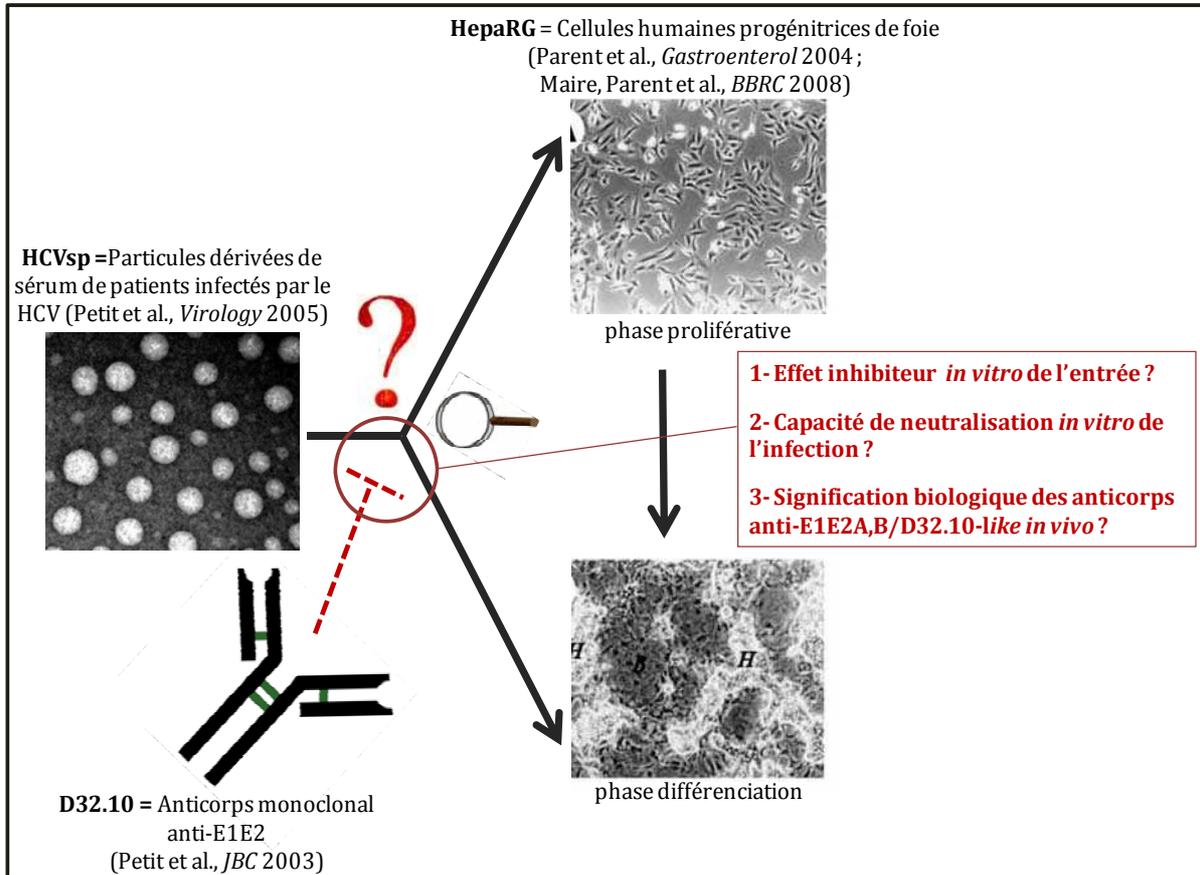
Les 3 régions correspondant à l'épitope reconnu par l'AcMo D32.10 sont impliquées dans des interactions virus-cellule et constituent des cibles reconnues par la réponse immunitaire de l'hôte.

Vu l'importance structurale et fonctionnelle de cet épitope E1E2, un de nos objectifs a été d'étudier d'abord l'effet inhibiteur de l'entrée et la capacité de neutralisation *in vitro* de l'anticorps D32.10 (**Figure 27**). Pour cela, nous avons développé plusieurs techniques *in vitro*, un test de liaison cellulaire ou « *cell-binding* » basé sur le marquage à l'Iode 125 des particules HCV sériques (HCVsp) et un système d'infection original des cellules HepaRG par des particules HCVsp.

L'autre objectif que nous nous sommes fixé et qui constitue la plus grande partie de mon projet de thèse, a été d'analyser la séroprévalence des anticorps de même spécificité que le D32.10 (anti-E1E2A,B) dans différents groupes de patients HCV positifs et de déterminer ensuite la relevance clinique de cette réponse humorale *in vivo* durant l'infection HCV (**Figure 27**). Pour cela, nous avons développé un test de détection des anticorps anti-E1E2A,B dont le principe repose sur l'utilisation de peptides synthétiques correspondant aux trois régions reconnues par l'anticorps (E1, E2A et E2B) adsorbés sur une surface solide.

## OBJECTIFS DES TRAVAUX

L'ensemble des résultats *in vitro* et *in vivo* a fait l'objet de 4 articles dont l'un a été publié dans le «*Journal of Medical Virology*», un est en révision dans *Hepatology*, un est soumis et un en préparation.



**Figure 27: Interactions entre les particules HCVsp et les cellules HepaRG : Capacité de neutralisation *in vitro* et *in vivo* de l'anticorps D32.10 ?**

# ***CHAPITRE III - RESULTATS***

---



**1. ARTICLE 1 : L'INHIBITION DES INTERACTIONS ENTRE LES PARTICULES HCV SERIQUES (HCVSP) ET LES HEPATOCYTES HUMAINS PAR L'ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-E1E2/D32.10**

**Inhibition of the Binding of HCV Serum Particles to Human Hepatocytes by E1E2-Specific D32.10 Monoclonal Antibody**

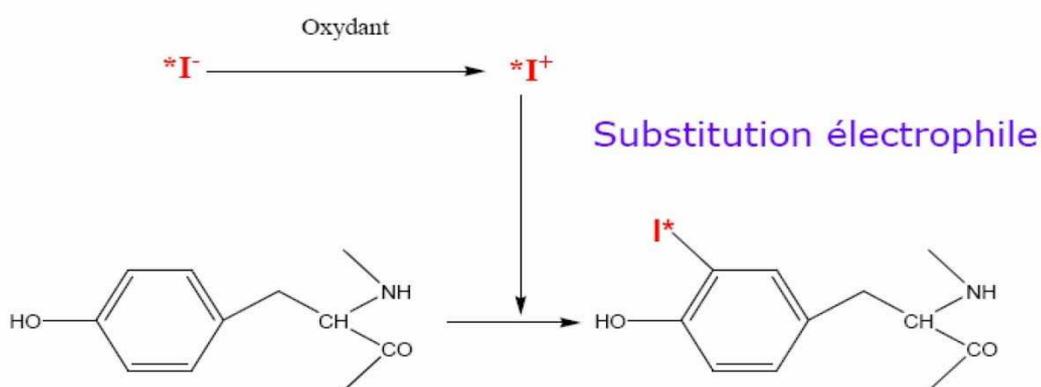
Ndiémé Ndongo, Yassine Rechoum, Sylvie De Sequeira, Fabien Zoulim,  
Christian Trépo, Emmanuel Drouet et Marie-Anne Petit

*Journal of Medical Virology* 81:1726–1733 (2009)



## ARTICLE 1

Dans le premier article, nous avons étudié les mécanismes d'interaction entre les particules virales circulantes (HCVsp) et leurs cellules cibles, les hépatocytes humains (Huh-7 et HepaRG) ; ainsi que la capacité de l'anticorps monoclonal anti-E1E2/D32.10 à inhiber ces interactions. D'abord, les particules HCVsp ont été marquées à l'Iode 125 ( $I^{125}$ ) par la chloramine T. Le principe de cette technique consiste en la fixation de l' $I^{125}$  sur les noyaux aromatiques de la protéine (essentiellement les tyrosines et les histidines) par substitution d'atomes d'hydrogène. L'iode réagit sur les cycles aromatiques sous forme de cations  $I^+$ . Ce cation est obtenu par oxydation sous l'effet d'agents chimiques tels que la chloramine T. Nous avons montré que les protéines d'enveloppe E1 et E2 étaient bien marquées à l' $I^{125}$  comme illustré par la **Figure 1** de l'article.



Par cette technique de marquage et de repérage, nous avons étudié les interactions entre les HCVsp et les cellules d'hépatome (Huh-7) ou les cellules HepaRG aux stades prolifératif ou différencié. La majorité des expériences de fixation ont été réalisées avec la population totale purifiée HCVsp-Lat de génotype 3. La fixation spécifique est calculée en soustrayant la fixation non spécifique (virus non marqué en excès en compétition avec le virus radiomarqué) de la fixation totale (particules radiomarkées fixées en fonction des particules radioactives non fixées). Les résultats obtenus montrent une fixation spécifique, saturable entre les HCVsp et les différentes cellules Huh-7, HepaRG à différents stades (prolifératif et différencié) (**Figure 2**). Toutefois, nous avons noté que la liaison spécifique représente 75% de la liaison totale dans le cas des cellules HepaRG différenciées, alors qu'elle ne représente que 25% dans le cas des cellules Huh-7. L'analyse des résultats par Scatchard permet de déterminer le nombre de site et la constante de dissociation (Kd). Ce Kd permet de déterminer l'affinité du ligand pour son

## ARTICLE 1

récepteur. L'affinité est d'autant plus élevée que la constante de dissociation est plus faible, et inversement. Ainsi, nous avons montré que l'interaction des HCVsp avec soit les cellules Huh-7 ou soit les HepaRG en prolifération impliquait deux types de fixation, une de basse affinité avec un  $K_d = 5-10 \mu\text{g/ml}$  et une de haute affinité avec un  $K_d = 0,1- 0,5 \mu\text{g/ml}$ . Par une approche de type scatchard, environ 500 à 2000 sites de haute affinité et 2000-10000 sites de basse affinité pour  $10^6$  cellules ont été estimés (**Figure 2A et B**). Concernant les cellules HepaRG différenciées, seuls des sites de haute affinité ont été identifiés avec 4000 sites estimés (**Figure 2C**). Ces résultats suggèrent que les particules HCVsp se fixent plus spécifiquement avec une forte affinité sur les cellules HepaRG au stade différencié que sur les cellules d'hépatome Huh-7. Ainsi les sites de haute affinité seraient préférentiellement exprimés à la surface de ces cellules qui sont constituées d'environ 40% de cellules de type hépatocytaire.

Après avoir validé ce test de « *cell-binding* », nous avons étudié l'effet inhibiteur de l'anticorps monoclonal anti-E1E2/D32.10. Nous avons démontré que cet anticorps est capable d'inhiber spécifiquement de façon dose dépendante et jusqu'à 100% les interactions entre HCVsp-Lat et les cellules Huh-7 et HepaRG (prolifératives ou différenciées) (**Figure 3A**). L'IC<sub>50</sub> du D32.10 ou la concentration nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition a été déterminée et est de  $0,5 \mu\text{g/ml}$  pour les cellules Huh-7 et les cellules HepaRG prolifératives et entre  $1-2 \mu\text{g/ml}$  pour les HepaRG différenciées. Alors qu'aucune inhibition non spécifique n'a pas été observée avec des immunoglobulines de souris (IgG1) irrelevantes dans le cas des cellules HepaRG différenciées. Avec des cellules Huh-7 et des cellules HepaRG en prolifération, une inhibition non spécifique a été obtenue de 10% à  $2 \mu\text{g/ml}$  et jusqu'à 40% à  $100 \mu\text{g/ml}$ . Ceci suggère une activité inhibitrice spécifique et efficace de l'anticorps anti-E1E2/D32.10 ( $\text{IC}_{50} \leq 1-2\mu\text{g/ml}$ ) sur les interactions entre les HCVsp et les hépatocytes *via* les sites de haute affinité. Dans ce système, nous avons analysé l'activité inhibitrice de l'anticorps monoclonal AP33 qui reconnaît un épitope linéaire dans la protéine E2 (412-423) et qui a été montré comme étant neutralisant dans les systèmes des HCVpp et des HCVcc. Nous avons démontré que l'AP33 inhibe seulement les interactions entre les HCVsp-Lat et les cellules HepaRG en prolifération de manière dose dépendante entre 20 et  $100 \mu\text{g/ml}$  avec une IC<sub>50</sub> de  $50 \mu\text{g/ml}$  (**Figure 3B**). A des concentrations inférieures à  $10 \mu\text{g/ml}$ , l'AP33 présente un effet inhibiteur faible (< 30%) en comparaison avec le

## ARTICLE 1

D32.10. Par conséquent, l'activité inhibitrice de l'AP33 apparaît beaucoup moins efficace (IC<sub>50</sub> x 100) que celle exercée par le D32.10.

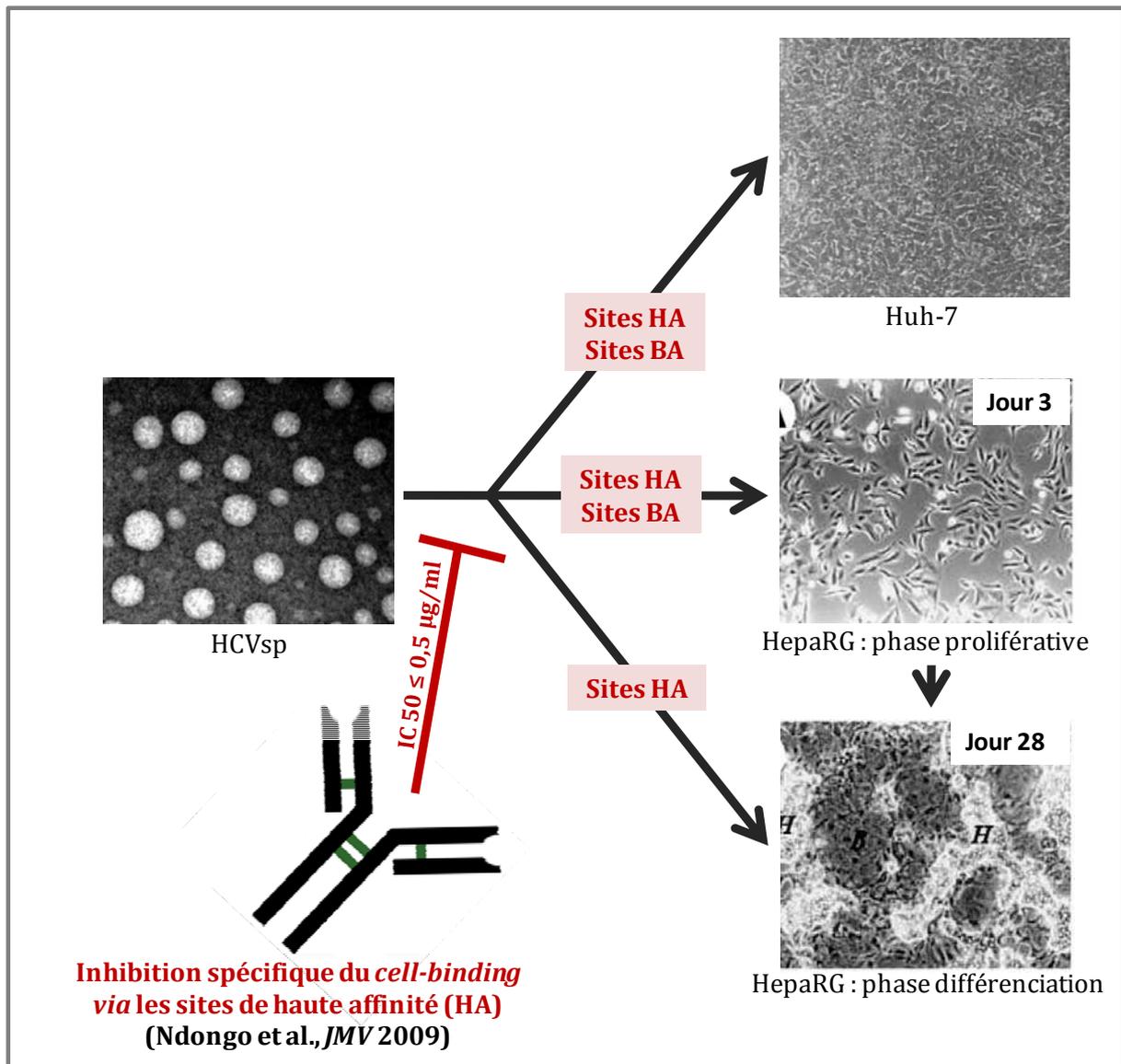
Ensuite, en utilisant sélectivement la population de particules HCV enveloppée (HCVsp-Lat E1E2/D32.10 positif), obtenue après ultracentrifugation sur gradient de saccharose, dans les essais de « *cell-binding* », nous avons montré une fixation spécifique et saturable dès une concentration de 0,5 µg de virus/ml (**Figure 4A**). L'analyse des données par Scatchard permet d'identifier uniquement des sites de haute affinité (K<sub>d</sub> très faible = 0,07 µg/ml). Ces observations suggèrent que les particules HCVsp enveloppées sont impliquées sélectivement dans les interactions de haute affinité (**Figure 4B**). Dans ces conditions, l'activité inhibitrice du D32.10 a été déterminée et est maximale entre 60 et 100% pour des concentrations de 0,5 à 5 µg/ml avec une IC<sub>50</sub> inférieure à 0,5 µg/ml (**Figure 4C**).

Pour confirmer nos résultats, nous avons utilisé une autre approche expérimentale de type cavRNA (*cell associated virus RNA*) préalablement développé par Germei [Germei et al., 2002]. C'est une méthode de quantification par RT-PCR en temps réel de l'ARN du HCV associé aux cellules après inoculation virale. L'inoculation du virus a été réalisée avec un sérum HCV (+) de génotype 1b et la capacité de fixation sur des cellules Huh-7. L'inoculation du virus avec des concentrations croissantes d'anticorps a montré que l'anticorps est capable d'inhiber de 60 à 70% l'adsorption des particules HCVsp sur les cellules Huh-7 pour des concentrations de 0,2 à 2 µg/ml (**Figure 5**). A ces concentrations un effet exercé par un anticorps irrelevant est < à 10% alors que pour des concentrations comprises entre 20 et 100 µg/ml cet effet est ≥ 45%. Ainsi, nous avons démontré que l'anticorps D32.10 inhibe spécifiquement et efficacement l'adsorption des particules HCVsp sur les cellules Huh-7 avec une concentration optimale de 2 µg/ml, comme précédemment. Ces résultats apparaissent donc indépendants du sérotype du virus et de l'approche expérimentale utilisée. L'anticorps monoclonal d32.10 s'avère alors particulièrement efficace pour inhiber ces interactions entre les HCVsp de génotype 3 ou 1b avec des hépatocytes polarisés proches des hépatocytes humains normaux.

En conclusion, les résultats obtenus au cours de cette étude suggèrent que les interactions de haute affinité (avec un K<sub>d</sub> faible) impliquent sélectivement l'épitope

## ARTICLE 1

E1E2, reconnu par l'anticorps D32.10 et exprimé à la surface des particules HCVsp enveloppées, ainsi que des récepteurs présents sur les cellules HepaRG hautement différenciées (**Figure 28**).



**Figure 28: Inhibition des interactions entre les particules HCVsp et les cellules hépatocytaires par l'anticorps monoclonal D32.10**

Les particules HCVsp interagissent avec les cellules hépatocytaires (Huh-7 et HepaRG) via des sites de haute (HA) ou basse affinité (BA). Par des études de cell-binding, l'AcMo D32.10 a été montré capable d'inhiber ces interactions de haute affinité avec une  $IC_{50}=0,5 \mu\text{g/ml}$ .

# Inhibition of the Binding of HCV Serum Particles to Human Hepatocytes by E1E2-Specific D32.10 Monoclonal Antibody

Ndiémé Ndongo,<sup>1,2</sup> Yassine Rechoum,<sup>3</sup> Sylvie De Sequeira,<sup>1,2</sup> Fabien Zoulim,<sup>1,2,4</sup> Christian Trépo,<sup>1,2,4</sup> Emmanuel Drouet,<sup>3</sup> and Marie-Anne Petit<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U871, Lyon, France

<sup>2</sup>Université Lyon 1, IFR62 Lyon-Est, Lyon, France

<sup>3</sup>Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI), Université Joseph Fourier, Grenoble I, UMR 5233 UJF-EMBL-CNRS, Grenoble, France

<sup>4</sup>Hospices Civils de Lyon, Hôtel Dieu, Service d'Hépatologie, Lyon, France

The aim of this study was to determine the inhibition of binding activity of the monoclonal antibody (mAb) D32.10 which recognizes a highly conserved discontinuous antigenic determinant (E1:297–306, E2:480–494, and E2:613–621) expressed on the surface of serum-derived HCV particles (HCVsp) of genotypes 1a, 1b, 2a, and 3a. To this end, an *in vitro* direct cell-binding assay based on the attachment of radiolabeled HCVsp was developed, and Scatchard plots were used to analyze ligand–receptor binding data. HCV adsorption was also assessed by quantitating cell-associated viral RNA by a real-time RT-PCR method. Saturable concentration-dependent specific binding of HCVsp to Huh-7 or HepaRG cells was demonstrated. The Scatchard transformed data showed two-site interaction for Huh-7 and proliferative HepaRG cells: the high-affinity binding sites ( $K_{d1} = 0.1–0.5 \mu\text{g/ml}$ ) and the low-affinity binding sites ( $K_{d2} = 5–10 \mu\text{g/ml}$ ), and one-site high-affinity binding model between E1E2/D32.10-positive HCVsp and hepatocyte-like differentiated HepaRG cells. The E1E2-specific mAb D32.10 inhibited efficiently (>60%) and selectively the binding with an  $\text{IC}_{50} \leq 0.5 \mu\text{g/ml}$  in all the experimental approaches using serum HCV of genotype either 3 or 1b. This supports the involvement of the E1E2/D32.10 discontinuous antigenic determinant in the interactions between human hepatocytes and HCVsp, and suggests that D32.10-like antibodies present in sera from patients infected with HCV could play a protective role. **J. Med. Virol. 81:1726–1733, 2009.**

© 2009 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** hepatitis C virus; serum particles; human hepatocytes; cell-binding assays; anti-E1E2 monoclonal antibody

## INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infects about 170 million people worldwide, causing chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma [Chisari, 2005]. Current treatments are not optimal, and a vaccine is not available to prevent HCV infection [Feld and Hoofnagle, 2005]. HCV is a positive-strand RNA virus in the *Flaviviridae* family that encodes a polyprotein of ~3,000 amino acids [Lindenbach et al., 2007]. Cellular signal peptidases and virally encoded proteases are involved in polyprotein processing to produce the structural proteins, core (C) and envelope glycoproteins 1 and 2 (E1 and E2), and the non-structural (NS) proteins NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B [Lindenbach et al., 2007]. Similar to other enveloped viruses, E1 and E2 envelope glycoproteins most likely play a pivotal role in HCV life cycle, that is, virus binding and entry, which are critical for tissue tropism and pathogenesis. Little is known about the molecular events that mediate cell entry for HCV. However, significant progress has been made with the development of several HCV models: HCV-like particles (HCV-LPs) produced in insect cells [Baumert et al., 1998; Triyatni et al., 2002; Wellnitz et al., 2002], HCV pseudotyped particles (HCVpp) displaying unmodified and functional E1 and E2 glycoproteins onto retroviral and lentiviral core particles [Hsu et al., 2003; Bartosch et al., 2003a,b], and cell-culture grown HCV (HCVcc) obtained after transfection of a unique HCV genotype 2a complete replicon (JFH-1) into Huh-7 or Huh7-derived

Grant sponsor: INSERM; Grant sponsor: Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS), France.

\*Correspondence to: Marie-Anne Petit, INSERM U871, 151 Cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, France.  
E-mail: marie-anne.petit@inserm.fr

Accepted 23 April 2009

DOI 10.1002/jmv.21562

Published online in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com)

cells (Huh-7.5 or Huh-7.5.1) [Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005]. By using such models, it was possible to observe that HCV enters into target cells in a multistep process involving glycosaminoglycans (GAGs) and more especially heparin-like GAGs which play a key role for the initial attachment of the virus, followed by the interaction with the tetraspanin CD81 among others [see for review, Dubuisson et al., 2008]. CD81 is now considered as a central regulator of cellular events required for HCV infection of human hepatocytes [Brazzoli et al., 2008]. However, the remaining limitations of HCVcc model are its tight dependence on the JFH-1 NS genes (replicase complex) of genotype 2a and that robust viral growth is observed only in immortalized tumor Huh-7 or Huh-7-derived cells that respond poorly to treatment with double-stranded RNA (dsRNA) [Foy et al., 2005]. Therefore, it is essential to extend entry studies to in vivo-produced HCV and other cell types than highly permissive Huh-7 sub-lines. It has been shown recently that serum-derived HCV infection of primary human hepatocytes is CD81 dependent [Molina et al., 2008]. However, the nature of the cell-virion combination appeared to be a determinant factor for virus entry.

Enveloped HCV particles have been identified previously in the serum of patients with chronic hepatitis C, so-called HCVsp [Petit et al., 2005], and a unique monoclonal antibody (mAb) D32.10 was described which recognizes a highly conserved discontinuous antigenic determinant (E1:297–306, E2:480–494, and E2:613–621) expressed on the surface of HCVsp (genotypes 1a, 1b, 2a, and 3a) [Petit et al., 2003, 2005]. Indeed, the two regions in the E2 glycoprotein include (i) putative CD81-binding region 1 (aa 474–492) and region 3 (aa 612–619) of HCV [Yagnik et al., 2000; Rothwangl et al., 2008], and (ii) highly conserved GAG-binding sites (PRR1: aa 482–488 and CR4: aa 615–621) [Olenina et al., 2005]. It has been shown recently that the CD81-binding region 3 (aa 612–619), which is highly conserved across genotypes, was responsible for mediating E2-binding CD81 [Rothwangl et al., 2008]. Although the CD81-binding region 1 (aa 474–492) of E2 has been reported not to mediate binding to CD81, it could play a role in HCVpp infectivity [Rothwangl et al., 2008]. Furthermore, human-derived mAbs against E1 (aa 288–326) have been shown to neutralize HCVpp infection (except genotype 3) as well as the infectivity of HCVcc of genotypes 1a and 2a [Meunier et al., 2008]. Thus, it was expected that D32.10 which recognizes one E1 and two E2 highly conserved regions important for HCV entry could be able to block HCV-cell interactions.

The molecular basis of interactions between HCVsp and human Huh-7 or highly differentiated liver progenitor HepaRG cells [Parent et al., 2004; Maire et al., 2008], and the inhibition of binding (IOB) activity of the E1E2-specific mAb D32.10 were investigated.

## MATERIALS AND METHODS

The primary aim of this study was to develop cell-binding assays to study HCVsp-cell (Huh-7 or HepaRG)

interactions. The study allowed the examination of saturation radioligand binding data by Scatchard plots and inhibitory activities of the D32.10 mAb.

## Cell Culture

HepaRG cells were cultured as described previously [Parent et al., 2004; Maire et al., 2008]. To induce the differentiated stage, HepaRG cells were not split after confluency reached at day 7, and maintained up to day 28–42 in a medium without DMSO but containing  $5 \times 10^{-5}$  M hydrocortisone hemisuccinate. Huh-7 cells were maintained in DMEM (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise Cedex, France) containing 4.5 g/ml glucose (Eurobio, Les Ulis, France) and supplemented with 10% FCS (Foetal Clone II, Hyclone, Thermo Fisher Scientific p/a Perbio Science France SAS, Brebières, France), 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, penicillin, and streptomycin (Cambrex Bio Science, St. Beaulieu, France).

## Virus Samples

HCVsp (Lat., genotype 3a) were purified from plasma-pheresis samples of a patient infected chronically by successive ultracentrifugation steps as described previously [Petit et al., 2005]. The final HCVsp-Lat total pellet (TP) was resuspended in TAN buffer (0.05 M triethanolamine [pH 8], 0.1 M NaCl) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The HCVsp-Lat TP sample contained  $10^6$  copies of HCV RNA or genome equivalents (Geq) per mg of protein. The E1E2 antigenic activity was positive up to 1 Geq or 1 ng of protein. The characteristics of particles from HCVsp-Lat TP were similar to those reported previously for another HCVsp TP preparation of genotype 1a/2a [Petit et al., 2005]. When the HCVsp-Lat TP preparation was analyzed in sucrose gradient, HCVsp-Lat E1E2/D32.10-positive fractions (EPF) were recovered as a peak at a density of 1.17 g/ml [Petit et al., 2005], and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for binding studies.

## Radioiodination of HCVsp

Purified HCVsp-Lat TP and EPF were radioiodinated according to the chloramine T method described by Tejedor and Ballesta [1982]. The radiolabeled proteins were separated from free iodine by passage on PD10 column (Amersham Biosciences, Orsay Cedex, France), then precipitated with trichloroacetic acid. Finally, radioactivity was counted before and after passage on the column (COBRA II, Auto-Gamma<sup>®</sup> Counting System, Packard Instruments S.A., Rungis, France). The yield was around 90% and the specific radioactivity 0.15  $\mu\text{Ci}$  per  $\mu\text{g}$  of protein or  $10^3$  Geq for low-affinity (LA) binding studies and 0.75  $\mu\text{Ci}$  per  $\mu\text{g}$  of protein or  $10^3$  Geq for high-affinity (HA) binding studies. After elution from PD10 column, the radiolabeled material was recovered as a single peak (Fig. 1A). By SDS-PAGE analysis in reducing conditions and autoradiography of  $^{125}\text{I}$ -labeled HCVsp-lat TP (Fig. 1B, panel a), two bands at the expected size of E1 and E2 were found labeled strongly

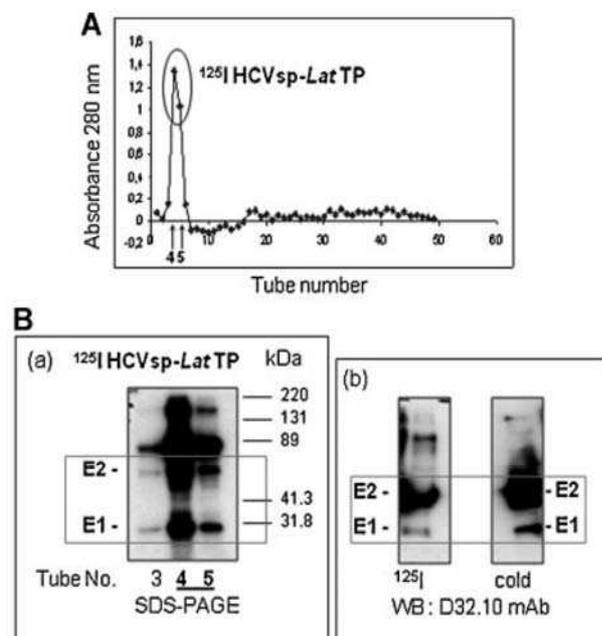


Fig. 1. A: Size-exclusion chromatography of radiolabeled ( $^{125}\text{I}$ ) HCVsp-Lat TP. The profile of elution from PD10 column. Absorbance at 280 nm was determined for each fraction (tube number). Radiolabeled-HCVsp-Lat TP was recovered in fractions 4 and 5 ( $\uparrow$ ). B: Analysis by SDS-PAGE and autoradiography of  $^{125}\text{I}$ -HCVsp-Lat TP (tubes no. 3–5, panel a). Experiments of Western blot (WB) using the D32.10 mAb (IgG, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) with either  $^{125}\text{I}$ -HCVsp-Lat (tube no. 4, left part of panel b) or unlabeled (cold) HCVsp-Lat TP preparation (right part of panel b) at the same concentration of 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Molecular weights are expressed in kDa and indicated on the right of panel a.

in two fractions #4 and #5. By Western blotting (WB) (Fig. 1B, panel b), same proteins from either  $^{125}\text{I}$ -HCVsp or from cold HCVsp were recognized by D32.10 mAb. Two major bands at the expected size of E1 and E2 were labeled strongly. Higher molecular weight species were seen in the gels, and could be potential contaminating bands and/or oligomeric forms of E1E2.

### Cell-Binding Assays and Scatchard Plot Analysis

At day 4 after plating, Huh-7 or HepaRG cells were incubated with RPMI 1640 (Invitrogen SARL) containing 0.05% trypsin and 0.02% EDTA to suspend the cells, washed with FCS containing culture medium, and resuspended in RPMI containing 1% bovine serum albumin (RPMI-BSA). Binding experiments were carried out in RPMI-BSA as described previously [Godard et al., 1992]. Cells ( $0.6 \times 10^6$  per well) were incubated with increasing concentrations of labeled HCVsp-Lat TP or EPF. Non-specific binding was evaluated by including a 200-fold excess of unlabeled HCVsp-Lat preparation (four experimental points). Incubation was performed under agitation for 2 hr at room temperature. Cell bound (B) and unbound (F) fractions were separated by centrifugation through a layer of dibutyl phthalate (85%) and paraffin oil (15%) [Godard et al., 1992]. Regression analysis of data and the Scatchard transformation were performed using the GraphPad PRISM Version 4.0 Software.

For IOB experiments, increasing concentrations from 0.2 to 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (cf. Table I) of D32.10 [Petit et al., 2003], AP33 [Tarr et al., 2006], or a mouse IgG1 $\kappa$  (MOPC-21, Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) as irrelevant control antibody were incubated for 1 hr at 37°C with a fixed, non-saturable concentration of labeled HCVsp-Lat TP or EPF before addition of cells for virus-binding experiments performed at room temperature as described above.

### Quantitation of Cell-Associated Viral RNA (cavRNA)

The experiments were carried out on Huh-7 cells cultured up to sub-confluence on 24-well plates ( $10^6$  cells per well) as described previously [Germi et al., 2002]. For binding studies, each well was inoculated with 200  $\mu\text{l}$  of FCS-free medium containing 45,000 copies of

TABLE I. Concentrations of Irrelevant, AP33, or D32.10 Monoclonal Antibodies Used in IOB Experiments

mAb concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Irrelevant MOPC-21 (Sigma–Aldrich)	Irrelevant RCA 1G6 (house)	AP33 mAb [Tarr et al., 2006]	D32.10 mAb [Petit et al., 2003]
0.2	n.d.	X	X <sup>a</sup>	X
0.5	n.d.	n.d.	X <sup>a</sup>	X
1.0	X	n.d.	X <sup>a</sup>	X
1.5	n.d.	n.d.	X <sup>a</sup>	X
2.0	X	X	X <sup>a</sup>	X
5.0	n.d.	n.d.	X <sup>a</sup>	X
10	X	n.d.	X	X
15	n.d.	n.d.	X	n.d.
20	n.d.	X	X	X
50	n.d.	n.d.	X	X
100	X	X	X	X
150	n.d.	n.d.	X	n.d.
200	n.d.	n.d.	X	X
300	n.d.	n.d.	X	n.d.

n.d., not determined.

X, concentration tested in 2 (AP33), 4 (RCA 1G6), or 10 (MOPC-1 and D32.10) independent experiments (in triplicate).

<sup>a</sup>Only included in one experiment in triplicate.

HCV RNA from serum sample positive for HCV of genotype 1b. After 2 hr of incubation at room temperature, non-adsorbed virus was eliminated by washing wells 5–6 times and the adsorbed cells collected by scratching in 200  $\mu$ l of FCS-free medium. The last wash was collected to measure residual HCV RNA. For inhibition of adsorption assays, the inoculum was incubated with D32.10 (0.2, 2.0, 20, or 100  $\mu$ g/ml) for 1 hr at room temperature before addition to cells. The mAb RCA 1G6 (IgG1) was used as a control (Table I). The viral load of the inoculum was  $4 \times 10^6$  copies/ml (COBAS AMPLICOR HCV MONITOR test, Roche Diagnostics, Meylan, France). The quantitation of *cav*RNA was carried out using the real-time one-step RT-PCR method on LightCycler instrument (Roche Diagnostics). The inhibition of adsorption by D32.10 was measured in 2–4 independent assays for each experiment.

## RESULTS

### Binding Properties of HCVsp to Huh-7 or Highly Differentiated HepaRG Cells

Binding assays were first conducted with radiolabeled purified HCVsp-Lat TP. The standard approach for analyzing saturation binding experiments was to subtract the non-specific curve from the total binding curve to determine the specific (receptor) binding for each concentration of the radioligand. Similarly, specific saturable binding of HCVsp-Lat TP to Huh-7 (Fig. 2A)

and HepaRG cells at proliferating (Fig. 2B) or differentiated (Fig. 2C) stage was shown to be concentration-dependent and to reach saturation between 3 and 5  $\mu$ g of protein/ml corresponding to  $3\text{--}5 \times 10^3$  Geq/ml (panels a). However, it is interesting to note that the degree of non-specific binding which was subtracted from the total binding by the use of the cold particles varied and decreased from 75% for Huh-7 cells to 50% for proliferating HepaRG cells and to only 25% for differentiated HepaRG cells. Thus, the binding of HCVsp to Huh-7 cells is much less specific (only 25%, reflected by no significant saturation of the curve, Fig. 2A) than the binding to HepaRG cells, especially when the cells are differentiated (75% of specific binding, Fig. 2C). The analysis by Scatchard plot yielded a linear representation (panels b) from saturation binding experiments in all the cases allowing the determination of the number of sites,  $B_{\max}$  (X-axis intercept), and the ligand affinity, as equilibrium dissociation constant or  $K_d$  (negative reciprocal of the slope). For Huh-7 and proliferating HepaRG cells, two classes of binding sites with HA  $K_{d1} = 0.1\text{--}0.5$   $\mu$ g/ml and LA  $K_{d2} = 5\text{--}10$   $\mu$ g/ml were identified (Fig. 2A and B, respectively, panels b). Once again it was noted that the HA-binding sites were much more difficult to define for the Huh-7 hepatoma cells than for highly differentiated HepaRG cells. Globally, from 20 independent experiments (each point in duplicate or triplicate), accessible HA-binding sites were estimated at 500–2,000 and LA-binding sites at 2,000–10,000 per

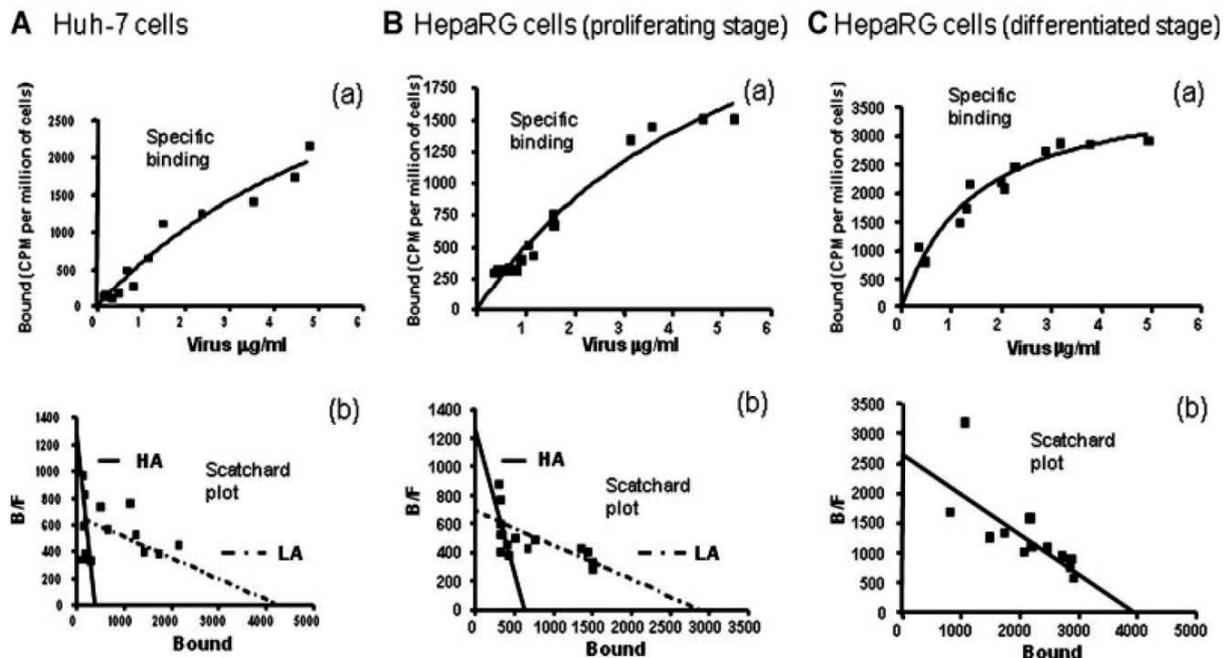


Fig. 2. Properties of the binding of  $^{125}$ I-HCVsp-Lat TP to human hepatocytes. **A:** Huh-7 cells. **B:** HepaRG cells at proliferating stage. **C:** HepaRG cells at differentiated stage. **Panels a:** Concentration-dependent saturable specific binding curves (bound or B) calculated by subtracting the non-specific curve (obtained in the presence of an excess of unlabeled ligand) from the total binding curve. **Panels b:** Scatchard plots formed with the GraphPad PRISM version 4.0 software. The ratio of B to F (Free) was calculated for each

concentration.  $^{125}$ I-HCVsp-Lat TP ( $1\text{--}5$   $\mu$ g of protein/ml, corresponding to  $10^3\text{--}5 \times 10^3$  Geq/ml) was incubated for 2 hr at room temperature with Huh-7 or HepaRG cells either at day 4 (prolif.) or at day 38 (diff.) after plating. The results are representative of at least 20 independent experiments for Huh7 or HepaRG prolif. and 6 independent experiments for HepaRG diff.  $B_{\max}$  is expressed in number of binding sites per  $10^6$  cells, and  $K_d$  in  $\mu$ g of protein/ml. HA, high affinity; LA, low affinity.

$10^6$  cells, corresponding to the binding of around 1 Geq/HA-binding site. Concerning the HepaRG cells at the differentiated stage (Fig. 2C) where hepatocyte-like cells represented around 40% of the total cell population [Parent et al., 2004], the analysis of the most specific saturation binding data (panel a) led to a one-site Scatchard plot (panel b) showing only one class of HA-binding sites with a significantly higher density ( $B_{\max}$  corresponding to approximately 4,000 sites per  $10^6$  cells) and a  $K_d$  value of 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (panel b). The results demonstrate that HCVsp particles bind more specifically to HepaRG cells than to Huh-7 immortalized tumor cells and that the HA-binding sites are expressed preferentially on the surface of hepatocyte-like differentiated HepaRG cells.

### Inhibition of Binding (IOB) by Anti-E1E2/D32.10 mAb

Preincubation of  $^{125}\text{I}$ -purified HCVsp-Lat TP for 1 hr at  $37^\circ\text{C}$  with D32.10 (purified IgG1) at increasing concentrations (cf. Table I) prior to cell-binding assays performed at room temperature showed that D32.10 inhibited specifically HCVsp-Lat TP binding to Huh-7 cells and HepaRG cells at the proliferating or differentiated stages from 0.2 to 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in a concentration-dependent manner (Fig. 3A). The inhibitory antibody concentration reducing the binding by 50% or  $\text{IC}_{50} = 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  for proliferating Huh-7 and HepaRG cells and around 1–2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for differentiated HepaRG cells (Fig. 3A). However, it was noted that non-specific inhibitory effect of an irrelevant mouse IgG1 was not observed with the differentiated HepaRG cells (not shown), whereas a similar non-specific inhibitory potency of 10% up to 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , of 25% at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and 40% at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was determined with both Huh-7 and proliferating HepaRG cells (Table I, Fig. 3B). This

suggests a very specific efficient IOB activity exerted by the anti-E1E2/D32.10 mAb (low  $\text{IC}_{50} \leq 1-2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) on the HCVsp–hepatocyte interactions through HA-binding sites.

As positive control, the IOB activity of the mouse mAb AP33, which recognizes a linear epitope in the E2 glycoprotein (E2:412–423) and is known to neutralize potently retroviral pseudoparticles (HCVpp) as well as the cell culture infectious HCV clone JFH-1 (HCVcc) [Tarr et al., 2006], was examined. When used at increasing concentrations (cf. Table I), AP33 inhibited only HCVsp-Lat TP binding to proliferating HepaRG cells in a concentration-dependent manner from 20 to 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  showing an  $\text{IC}_{50}$  around 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and exerted an inhibitory effect of  $\leq 30\%$  at lower concentrations ( $\leq 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) unlike the mAb D32.10 (Fig. 3C). As shown in Figure 3B, irrelevant mouse IgG1 (MOPC-21) at concentrations  $\geq 10 \mu\text{g}/\text{ml}$  inhibited the HCVsp binding from 25% up to 40% in a non-specific manner. Therefore, the IOB activity of AP33 appears much less efficient (100-fold higher  $\text{IC}_{50}$ ) and significant (non-specific inhibition  $\geq 40\%$ ) at such high concentrations ( $\geq 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) in contrast to that of D32.10 for inhibiting the interactions between HCVsp and highly differentiated HepaRG cells.

When  $^{125}\text{I}$ -HCVsp-Lat E1E2-positive fractions (EPF) from sucrose gradient were used selectively in HepaRG cell-binding assays, the saturation plateau of specific binding was reached from 0.5  $\mu\text{g}$  of protein/ml (Fig. 4A, panel a). Transformation of the data into Scatchard plot (Fig. 4A, panel b) showed that only a one-site binding was identified with a very HA low  $K_d = 0.07 \mu\text{g}/\text{ml}$ . From three independent experiments the average  $K_d$  was  $0.05 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Since the  $K_d$  is lower, the affinity of E1E2-positive HCVsp for hepatocyte-like HepaRG cells is higher than that of the total HCVsp population. This

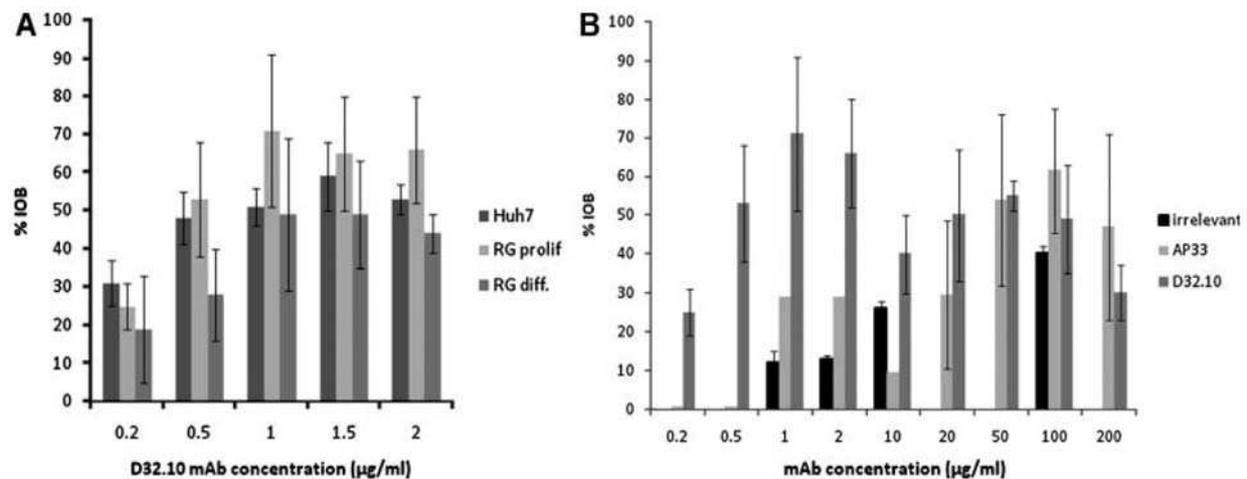


Fig. 3. A: Inhibition of the binding of HCVsp-Lat TP to Huh-7 and HepaRG cells by E1E2-specific D32.10 mAb.  $^{125}\text{I}$ -HCVsp-Lat TP was preincubated with increasing concentrations of D32.10 (0.2–2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , cf. Table I) for 1 hr at  $37^\circ\text{C}$ . The HCVsp-D32.10 immune complexes were then incubated for 2 hr at room temperature with Huh-7 or HepaRG cells at proliferating (RG prolif.) or differentiated (RG diff.) stages. B: Inhibition of the binding of HCVsp-Lat TP to proliferating HepaRG cells by an irrelevant mouse IgG1 (MOPC-21) and by the AP33

mAb in comparison with the mAb D32.10. Preincubation of HCVsp-Lat TP was performed with 1, 2, 10, or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of the irrelevant mAb (Table I) as non-specific control. Preincubation of HCVsp-Lat TP was performed with 0.2–200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of AP33 mAb or D32.10 mAb (cf. Table I). The results represented correspond to mean values  $\pm$  standard deviation (SD) of 10 independent experiments for MOPC-21 (irrelevant) and D32.10 (panels A,B), and of 2 independent experiments for AP33 (cf. Table I).

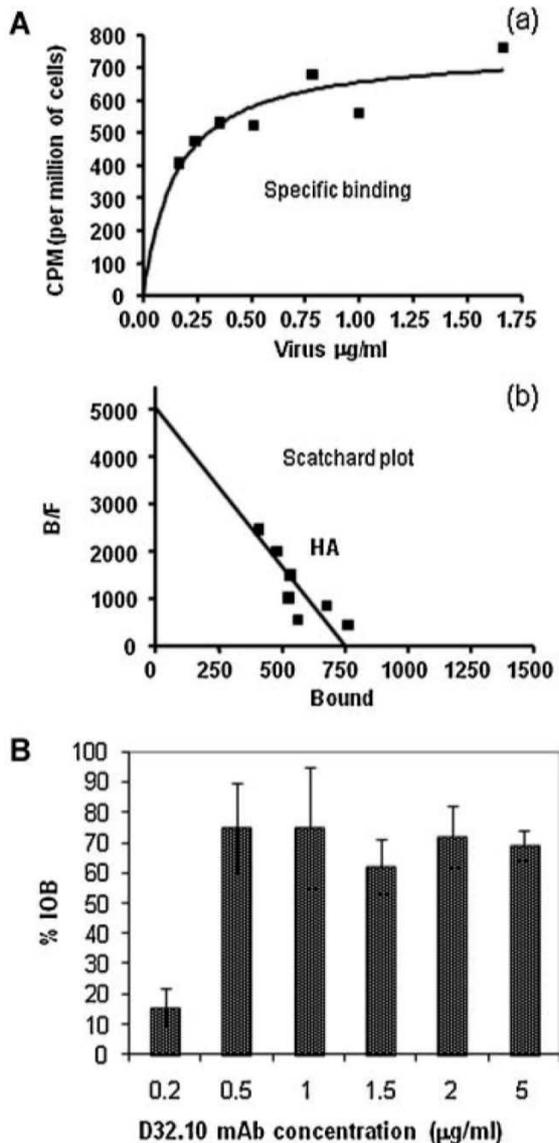


Fig. 4. A: Properties of the binding of  $^{125}\text{I}$ -E1E2-enveloped HCVsp-Lat (EPF) to HepaRG cells at proliferating stage. **Panel a:** Concentration-dependent saturable specific binding. **Panel b:** Scatchard plot. The results are representative of three independent experiments. **B:** Inhibition of the binding of HCVsp-Lat EPF to proliferating HepaRG cells by E1E2-specific D32.10 mAb. HCVsp-Lat EPF was preincubated with increasing concentrations of D32.10 (0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, or 5  $\mu\text{g/ml}$ ). The results are expressed in % of IOB and represent the mean values  $\pm$  SD of three independent experiments. Non-specific inhibition was  $<10\%$  by using the MOPC-21 irrelevant mAb under these experimental conditions.

suggests that the enveloped HCVsp are involved selectively in HA interactions. Under these conditions, maximal IOB by D32.10 (60–100%) was obtained for concentrations between 0.5 and 5  $\mu\text{g/ml}$  and the  $\text{IC}_{50}$  was lower than 0.5  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 4B). Non-specific IOB was not observed with an irrelevant antibody used at concentrations  $\leq 5 \mu\text{g/ml}$  (results not shown). This supports that the E1E2 discontinuous conformational epitope targeted by D32.10 and expressed on the surface of enveloped HCVsp exhibits particular HA for their corresponding HepaRG cell receptor(s).

Finally, to support these results the *cavRNA* approach [Germi et al., 2002] was performed and validated with an HCV1b-positive serum sample and Huh-7 cells. The incubation of the virus with increasing concentrations of D32.10 before the binding assay resulted in a strong significant inhibitory effect at 0.2 and 2  $\mu\text{g/ml}$  concentrations (60–70%, Fig. 5). An irrelevant mAb used at same concentrations exerted an inhibitory effect  $<10\%$ , whereas a high non-specific inhibition ( $\geq 45\%$ ) was observed at 20 or 100  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 5). Thus, it was demonstrated that the mAb D32.10 inhibits specifically and efficiently the adsorption of serum HCV of genotype 1b to Huh-7 cells with an optimal concentration of 2  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 5B). The IOB activity of D32.10 thus appears to be independent of the genotype as well as of the experimental approach.

## DISCUSSION

This study was undertaken to determine the IOB ability of the unique D32.10 mAb [Petit et al., 2003]. Indeed, D32.10 recognizes a highly conserved conformational epitope encompassing one region in the E1 glycoprotein and two regions in the E2 glycoprotein, which are exposed on the surface of enveloped HCVsp [Petit et al., 2005] and may be involved in HCV–cell interactions through GAG- and CD81-binding sites [Yagnik et al., 2000; Olenina et al., 2005; Rothwangl et al., 2008]. In this study, an in vitro direct cell-binding assay [Godard et al., 1992] was first adapted to particulate ligand such as HCV particles for examining the saturation radioligand binding data by nonlinear regression in order to determine the receptor number and affinity. This approach allowed the measurement of specific radiolabeled-HCVsp binding at equilibrium at various concentrations of the radioligand and the estimation of non-specific binding of this radioligand as that obtained in the presence of a large excess of

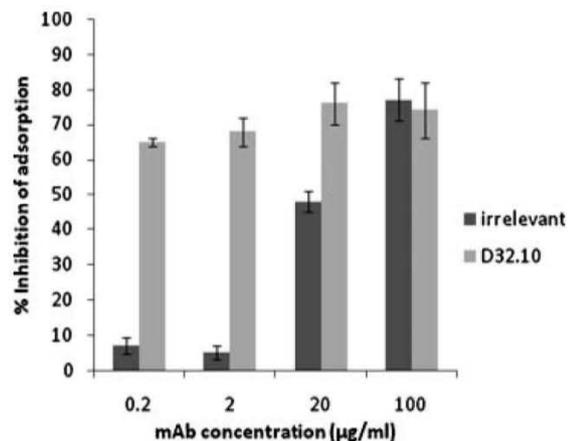


Fig. 5. Inhibition of the adsorption of HCV1b to Huh-7 cells by E1E2-specific D32.10 mAb in *cavRNA* approach. Plasma was incubated with the irrelevant RCA 1G6 IgG1 or the D32.10 mAb (0.2, 2, 20, and 100  $\mu\text{g/ml}$ ) before the binding assays. The results are expressed in percentage of inhibition of the adsorption corresponding to HCV RNA copies determined by real-time RT-PCR for each concentration. The mean values and the SD represent four independent assays.

unlabeled ligand. Therefore, it was not necessary to include a negative control in these experiments. To transform HCVsp–cell binding data into a linear form, the most popular Scatchard method was applied to estimate the  $B_{\max}$  and  $K_d$  from Scatchard plots. Evidence was provided by these studies for a two-site interaction between HCVsp and proliferating Huh-7 or HepaRG cells. One interaction of HA with a  $K_d$  of 0.1–0.5  $\mu\text{g/ml}$ , and one interaction of lower affinity (LA) with a  $K_d$  of 5–10  $\mu\text{g/ml}$ . The HA interaction was difficult to identify with the Huh-7 cells which seemed to expose preferentially LA-binding sites. In contrast, only HA interactions were identified clearly between HCVsp and the differentiated HepaRG cells, suggesting that these interactions could be more specific for polarized hepatocytes [Parent et al., 2004]. Both types of interactions could be identified easily with the proliferating HepaRG cells.

Moreover, when E1E2/D32.10-positive enveloped HCVsp were used selectively for binding studies, only HA interactions with a very low  $K_d$  ( $<0.1 \mu\text{g/ml}$ ) were observed with the proliferating HepaRG cells. The findings of the present study suggest that specific HA interactions (low  $K_d$ ) involve preferentially the conformational E1E2 epitope targeted by D32.10 on the surface of HCVsp and binding sites (receptors) mainly expressed on highly differentiated HepaRG liver cells. Supporting this view, the anti-E1E2/D32.10 mAb was shown to inhibit specifically and strongly the binding between HCVsp and Huh-7 or HepaRG cells with an  $IC_{50} = 0.5 \mu\text{g/ml}$ , but appeared still more efficient when E1E2-positive enveloped HCVsp were used exhibiting an  $IC_{50} < 0.5 \mu\text{g/ml}$ . When an irrelevant mAb was used, no or low inhibitory effect (10–15%) was observed for concentrations  $<10 \mu\text{g/ml}$  whereas an inhibitory effect of 25–40% could be observed for concentrations  $>10 \mu\text{g/ml}$ . This supports a highly specific effect of the mAb D32.10 to inhibit HCVsp–cell interactions. If the mAb AP33, which is well known to be capable of neutralization of E1E2-mediated entry and HCV infectivity in HCVpp and HCVcc systems [Tarr et al., 2006], was used in a same approach, a dose-dependent inhibitory effect was observed only when relatively high concentrations ( $>10 \mu\text{g/ml}$ ) were used. The mAb AP33 exerted a maximal inhibition of around 65% at a concentration of 100  $\mu\text{g/ml}$ , corresponding to an  $IC_{50} = 50 \mu\text{g/ml}$  in our system. This finding is in accordance with the results obtained previously with the HCVcc system, since HCVcc infectivity was reduced by 80% when AP33 was added to the JFH-1 virus inoculum at a concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$ . Similar inhibitory effect was also observed by using the mAb D32.10 at such high concentrations (20–200  $\mu\text{g/ml}$ ). In contrast, very low inhibitory effect ( $<30\%$ ) was observed with the mAb AP33 at low concentrations. This should be noted that only the effects at concentrations below 2  $\mu\text{g/ml}$  seem to be highly specific to inhibit efficiently HCVsp–cell interactions.

In conclusion, the mAb D32.10 through its unique discontinuous epitope formed by three highly conserved regions in the E1 and E2 glycoproteins and expressed on

the surface of in vivo produced HCV particles, named HCVsp, exhibits a particular efficiency for inhibiting the HA interactions between HCVsp (genotype 3 or 1b) and Huh-7 or highly differentiated hepatocyte-like HepaRG cells. This strongly suggests a potential neutralizing activity of the mAb D32.10 in vitro on HCVcc and/or HCVsp infectivity (now in progress) and in vivo in patients infected with HCV as well as in a human liver-chimeric mouse model as shown recently with AR3 human mAbs [Law et al., 2008]. Thus, the mAb D32.10 may be an useful tool in preventing HCV infection, especially after exposure to HCV-positive blood and recurrence of HCV after liver transplantation in patients with cirrhosis, and for developing a vaccine candidate based on the HCV E1E2/D32.10 epitope.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Raphaële Germe (FRE 2854 CNRS/Université Joseph Fourier, La Tronche-Grenoble, France) for transferring the *cav*RNA approach, Jean-Pierre Zarski (Unité d'Hépatogastroentérologie, Hôpital Général de Grenoble, France) and Fabien Zoulim (Service d'Hépatologie et de Gastro-Entérologie, Hôtel Dieu, Hospices Civils de Lyon, France) for providing HCV1b-positive serum and plasmaphereses from patient Lat, Arvin H. Patel (MRC Virology Unit, Institute of Virology, University of Glasgow, Glasgow, UK) for the AP33 mAb.

## REFERENCES

- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197:633–642.
- Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. 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.
- Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ. 1998. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 72:3827–3836.
- Brazzoli M, Bianchi A, Filippini S, Zhu Q, Pizza M, Crotta S. 2008. CD81 is a central regulator of cellular events required for HCV infection of human hepatocytes. *J Virol* 82:8316–8329.
- Chisari FV. 2005. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 436:930–942.
- Dubuisson J, Helle F, Cocquerel L. 2008. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol* 10:821–827.
- Feld JJ, Hoofnagle JH. 2005. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 436:967–972.
- Foy E, Li K, Sumpter R, Jr., Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M, Jr. 2005. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2986–2991.
- Germe R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RWH, Zarski JP, Drouet E. 2002. Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol* 68:206–215.
- Godard A, Heymann D, Raheer S, Anegón I, Peyrat MA, Le Mauff B, Mouray E, Gregoire M, Virdee K, Soullillou JP, Moreau F, Jacques Y. 1992. High and low affinity receptors for human interleukin for DA cells/leukemia inhibitory factor on human cells. *J Biol Chem* 267:3214–3222.
- Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate

- pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7271–7276.
- Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamatakis Z, Gastaminza P, Chisari FV, Jones IM, Fox RI, Ball JK, McKeating JA, Kneteman NM, Burton DR. 2008. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 14:25–27.
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623–626.
- Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. 2007. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Maire M, Parent R, Morand AL, Alotte C, Trépo C, Durantel D, Petit MA. 2008. Characterization of the double-stranded RNA responses in human liver progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 368:556–562.
- Meunier JC, Russell RS, Goossens V, Priem S, Walter H, Depla E, Union A, Faulk KN, Bukh J, Emerson SU, Purcell RH. 2008. Isolation and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the E1 glycoprotein of hepatitis C virus. *J Virol* 82:966–973.
- Molina S, Castet V, Pichard-Garcia L, Wychowski C, Meurs E, Pascucci JM, Sureau C, Fabre JM, Sacunha A, Larrey D, Dubuisson J, Coste J, McKeating JA, Maurel P, Fournier-Wirth C. 2008. Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol* 82:569–574.
- Olenina LV, Kuzmina TI, Sobolev BN, Kuraeva TE, Kolesanova EF, Archakov AI. 2005. Identification of glycosaminoglycan-binding sites within hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Viral Hepat* 12:584–593.
- Parent R, Marion MJ, Furio L, Trépo C, Petit MA. 2004. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* 126:1147–1156.
- Petit MA, Jolivet-Reynaud C, Peronnet E, Michal Y, Trépo C. 2003. Mapping of a conformational epitope shared between E1 and E2 on the serum-derived human hepatitis C virus envelope. *J Biol Chem* 278:44385–44392.
- Petit MA, Lièvre M, Peyrol S, De Sequeira S, Berthillon P, Ruigrok RWH, Trépo C. 2005. Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. *Virology* 336:144–153.
- Rothwangl KB, Manicassamy B, Uprichard SL, Rong L. 2008. Dissecting the role of putative CD81 binding regions of E2 in mediating HCV entry: Putative CD81 binding region I is not involved in CD81 binding. *Virol J* 5:46–58.
- Tarr AW, Owsianka AM, Timms JM, McClure CP, Brown RJP, Hickling TP, Pietschmann T, Bartenschlager R, Patel AH, Ball JK. 2006. Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. *Hepatology* 43:592–601.
- Tejedor F, Ballesta JP. 1982. Iodination of biological samples without loss of functional activity. *Anal Biochem* 127:143–149.
- Triyatni M, Saunier B, Maruvada P, Davis AR, Ulianich L, Heller T, Patel A, Kohn LD, Liang TJ. 2002. Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: A model system for studying viral binding and entry. *J Virol* 76:9335–9344.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11:791–796.
- Wellnitz S, Klumpp B, Bart H, Ito S, Depla E, Dubuisson J, Blum HE, Baumert TF. 2002. Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. *J Virol* 76:1181–1193.
- Yagnik AT, Lahm A, Meola A, Roccasecca RM, Ercole BB, Nicosia A, Tramontano A. 2000. A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins* 40:355–366.
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9294–9299.

**2. ARTICLE 2 : L'ETABLISSEMENT DE L'INFECTION, LA PRODUCTION ET LA PROPAGATION DU VIRUS DE L'HEPATITE C SERIQUE DEPENDENT DE L'ETAT DE PROLIFERATION/ DIFFERENCIATION DE CELLULES HUMAINES PROGENITRICES DU FOIE : INHIBITION PAR L'ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-E1E2/D32.10**

**Infection settling, replication and propagation of serum hepatitis C virus particles (HCVsp) depend on the proliferation/differentiation stage of human HepaRG liver progenitor cells: inhibition by E1E2- specific D32.10 monoclonal antibody**

Ndiémé Ndong, Sylvie De Sequeira, Simone Peyrol,  
Christian Trépo, Marie-Anne Petit

*Manuscrit en préparation*

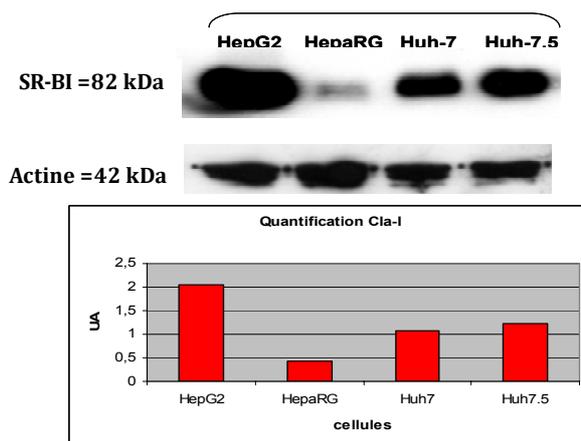


## ARTICLE 2

Le but de cette étude est de développer un système d'infection *in vitro* du HCV avec des composantes fonctionnellement proches de l'infection *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé d'une part des particules virales provenant de sérum de patients chroniquement infectés par le HCV [Petit et al., 2005] et d'autre part des cellules progénitrices du foie, les cellules HepaRG présentant des propriétés fonctionnelles voisines des hépatocytes humains normaux (HHN) en cultures primaires [Gripon et al., 2002; Parent et al., 2004]. Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression des récepteurs potentiels du virus à la surface de ces cellules HepaRG.

### 1) Expression des candidats récepteurs du HCV à la surface des cellules HepaRG

L'expression de la protéine SR-BI sur les cellules HepaRG a été étudiée en comparaison avec les cellules HepG2 qui ont permis d'identifier cette molécule comme récepteur potentiel du HCV, et les cellules Huh-7 et leurs dérivées (Huh-7.5) [Blight et al., 2003]. Les résultats représentés sur la **Figure 29** montrent la présence d'une bande de 80-82 kDa correspondant à la forme monomérique de la protéine. Toutefois, une relative faible expression de SR-BI est observée dans les cellules HepaRG comparée à celle détectée dans les cellules HepG2 ainsi que dans les cellules Huh-7 et Huh-7.5 pour une même quantité de protéines cellulaires déposées et un signal identique pour l'actine. Une analyse semi-quantitative permet d'estimer cette expression dans les cellules HepaRG à 50% de celle des cellules Huh-7 et 25% de celle des cellules HepG2.

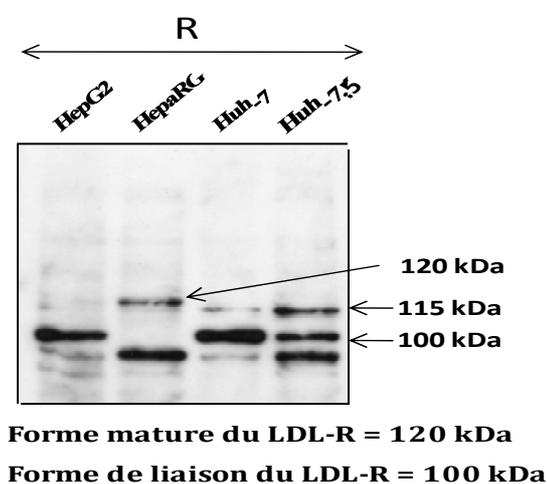


**Figure 29: Expression de SR-BI sur les cellules d'origine hépatique.**

L'expression de la protéine SR-BI sur les cellules hépatiques (HepG2, HepaRG, Huh-7 et Huh-7.5) a été analysée en western blot en utilisant l'anticorps anti-SR-BI (Cla1) de BD Biosciences.

## ARTICLE 2

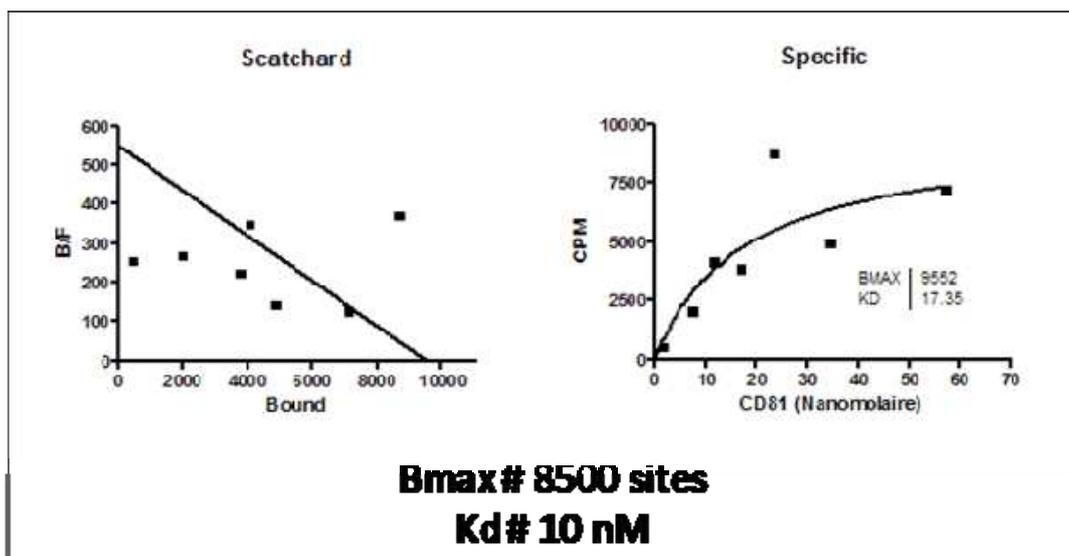
Parallèlement, nous avons étudié l'expression du récepteur aux LDL (LDL-R) sur ces mêmes cellules. En conditions réductrices, nous notons la présence d'une bande de 120 kDa correspondant à la forme mature du LDL-R seulement dans les cellules HepaRG et une bande de 115 kDa dans les cellules d'hépatome Huh-7 et Huh-7.5 (**Figure 30**). Une bande de 100 kDa (forme de liaison du LDL-R) est présente dans les cellules HepG2, Huh-7 et Huh-7.5 mais absente dans les cellules HepaRG. La présence de plusieurs formes moléculaires du LDL-R (120, 115 et 100 kDa) en conditions réductrices confirme l'hétérogénéité de ce récepteur. Il a déjà été rapporté que les hépatocytes en cultures primaires expriment faiblement le LDL-R contrairement aux cellules transformées [Nahmias et al., 2006]. Ceci peut expliquer la différence d'expression du LDL-R sur les cellules HepaRG et sur les cellules d'hépatomes humains (HepG2, Huh-7 et Huh-7.5).



*Figure 30 : Expression de LDL-récepteur sur les cellules hépatiques.*

*Les cellules HepG2, HepaRG, Huh-7 et Huh-7.5 sont analysées par western blot en conditions réductrices (R).*

L'expression de la tétraspanine CD81, récepteur potentiel du HCV impliquée dans le processus d'entrée virale, a été analysée en western blot en utilisant l'anticorps anti-CD81 (TS81) qui nous a été fourni par E. Rubinstein (INSERM U602, Paris). Ces anticorps anti-CD81 ne permettent pas la détection de la protéine dans les différentes cellules hépatocytaires. Par une approche de *cell-binding* après marquage de l'anticorps avec l'Iode 125, nous avons recherché l'expression de CD81 dans les cellules HepaRG. Nous avons estimé environ 8500 sites de relative haute affinité dans les cellules HepaRG avec une constante de dissociation,  $K_d = 10$  nM (**Figure 31**).



*Figure 31: Expression de la protéine CD81 à la surface des cellules HepaRG*

L'AcMo anti-CD81 (TS81 de Rubinstein) a été utilisé dans des expériences d'inhibition de cell-binding. De nombreux sites (8500) ont été estimés et la constante de dissociation,  $K_d$  est de 10 nM.

En conclusion, nous avons montré que les cellules HepaRG expriment à leur surface la protéine CD81 de façon comparable aux cellules Huh-7 (résultats non montrés), la protéine SR-B1 en quantité moindre par rapport aux cellules d'hépatome ainsi différentes formes du récepteur aux LDL (LDL-R).

## **2) Les cellules HepaRG sont susceptibles à l'infection au stade prolifératif**

L'infection des cellules HepaRG a été réalisée en utilisant des particules HCVsp de génotype 3a provenant d'un patient porteur chronique (**Figure 32**). Ces cellules sont infectées avec un MOI (*multiplicity of infection*) de 1 au troisième jour (J3) après la mise en culture des cellules en présence de sérum humain normal (SHN) qui a été montré favorisant l'infectivité des HCVpp. L'ARN viral a été analysé par RT-PCR puis quantifié par RT-PCR en temps réel à partir des surnageants de culture.

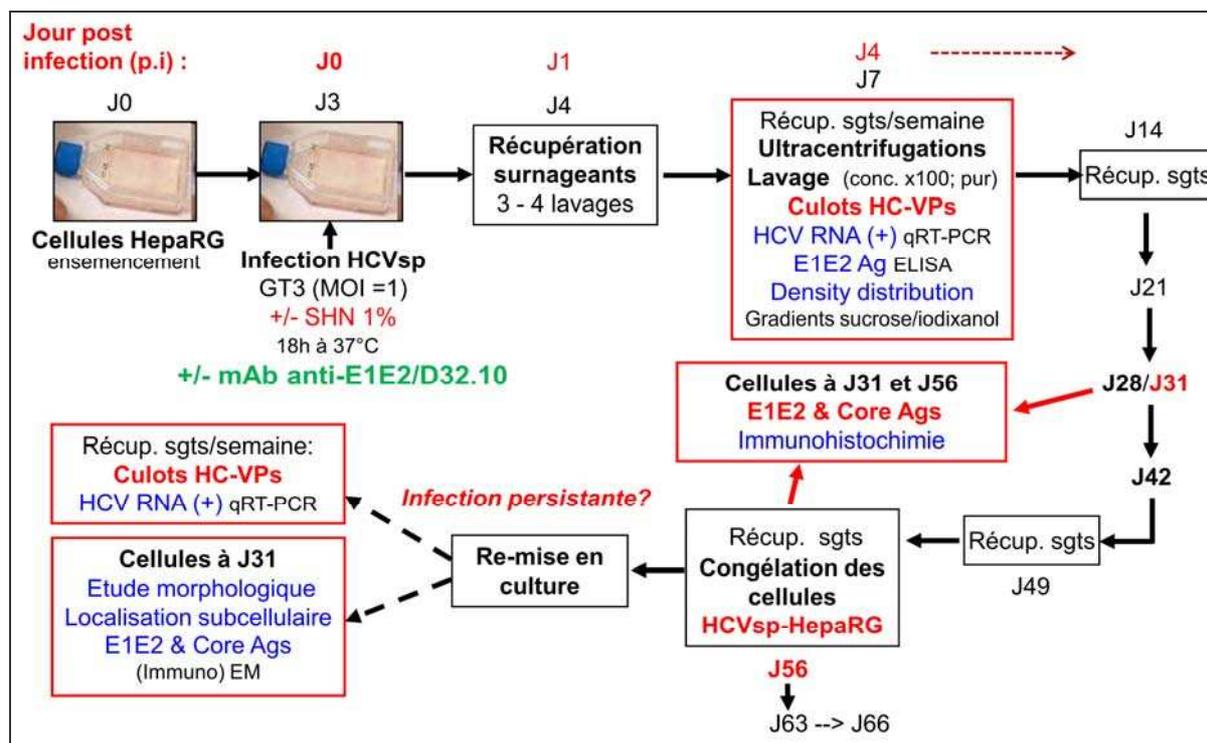


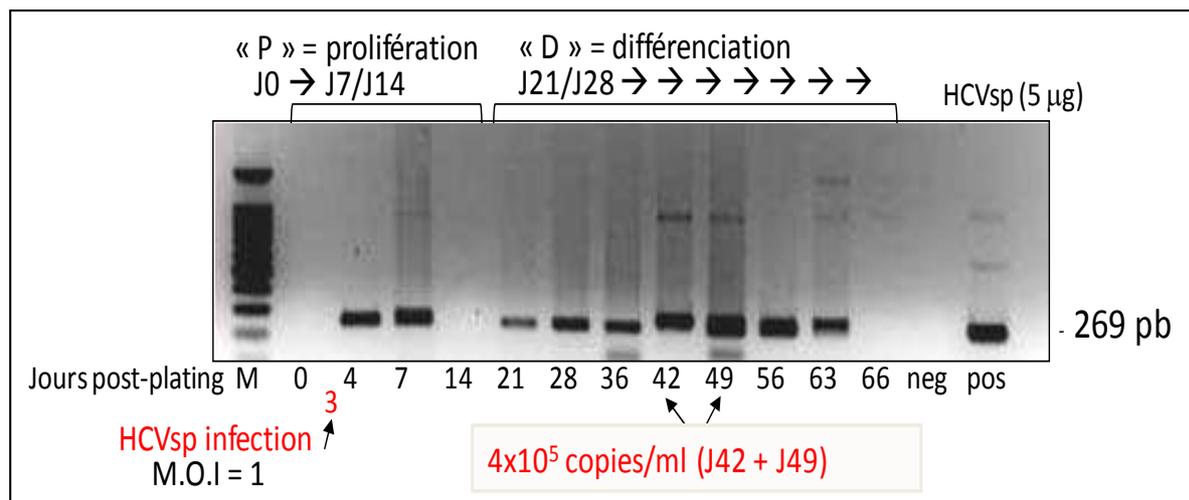
Figure 32: Protocole expérimental d'infection des cellules HepaRG

La cinétique obtenue est représentée sur la **Figure 33**. Dans ces conditions, de l'ARN viral en quantité importante a été détectée dans les surnageant à J4 et J7 post ensemencement (p.e), ce dernier étant probablement constitué du virus n'ayant pas pénétré dans les cellules. Il s'en suit une négativation de l'ARN du HCV dans le surnageant à J14 qui permet d'éliminer l'hypothèse selon laquelle l'ARN viral détectée serait un reliquat de l'inoculum de départ. Une production de particules virales contenant de l'ARN est observée à partir de J21 et jusqu'à J63 p.e. avec un maximum de détection à J42 et J49 correspondant à  $4 \times 10^5$  copies/ml. Des bandes non spécifiques sont détectées pour certains échantillons et laissent supposer à l'existence de mutations adaptatives. L'infection au stade prolifératif en l'absence de SHN résulte en une production/détection de l'ARN du HCV similaire mais avec un profil cyclique décalé dans le temps. De ce fait, le SHN semble avoir un effet sur l'infection et permet d'avoir un profil de production virale continu et une meilleure synchronisation de l'infection.

Nous avons ainsi démontré que l'infection par le HCV sérique s'établit dans les cellules HepaRG en phase de prolifération. La production de l'ARN du HCV est alors observée au stade différencié où ces cellules présentent une morphologie (polarisation, jonctions

## ARTICLE 2

serrées, canalicules biliaires,..) et une fonctionnalité (transport Golgi/RE actif, augmentation du flux de protéines sécrétées, métabolisme normal, ...) proches des hépatocytes humains normaux. L'infection au stade différencié donne des résultats beaucoup moins satisfaisants et reproductibles. Nous avons par contre obtenu des résultats reproductibles dans plusieurs mains lorsque les cellules HepaRG sont infectées avec les particules HCVsp au stade prolifératif en présence de SHN avec une production d'ARN viral au stade différencié.



**Figure 33: Cinétique de production d'ARN du HCV.**

*L'infection des cellules HepaRG se fait au stade prolifératif (Jour 3 post inoculation) avec un MOI de 1 en présence de sérum humain normal (SHN)*

### **3) Caractérisation des particules virales produites**

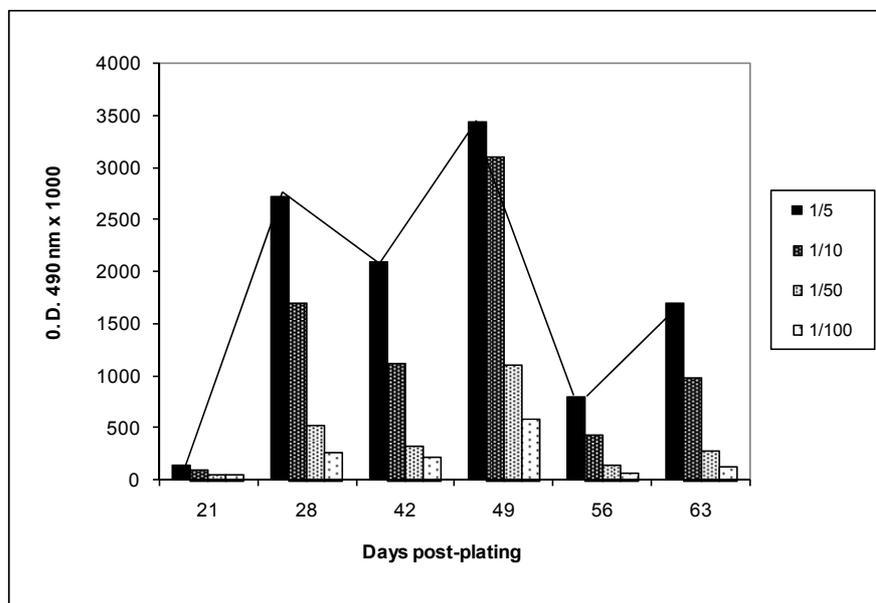
Les particules HCV ont été purifiées à partir de surnageants de culture par des étapes successives d'ultracentrifugation. Le culot obtenu est ainsi enrichi en particules virales et utilisé pour des études immunologiques et physico-chimiques.

#### **3.1. Activité antigénique E1E2**

L'activité antigénique des particules produites a été analysée par ELISA en utilisant l'anticorps anti-E1E2/D32.10. Les résultats représentés sur le **Figure 34** montrent une forte réactivité E1E2 vis-à-vis du D32.10 entre J28 et J49 (phase de différenciation) correspondant au pic de détection de l'ARN viral. La limite de dilution des échantillons à différents temps (J28, J42 et J49 p.e.) a été déterminé et est > 1/100. Ces résultats

## ARTICLE 2

montrent qu'il existe une bonne corrélation entre l'activité antigénique E1E2 et la détection de l'ARN (+) du HCV. Ainsi, des particules HCV contenant de l'ARN viral et exprimant l'épitope E1E2 reconnu par l'anticorps monoclonal D32.10 sont nouvellement synthétisées entre J25 et J44 soit environ 6 semaines après infection.

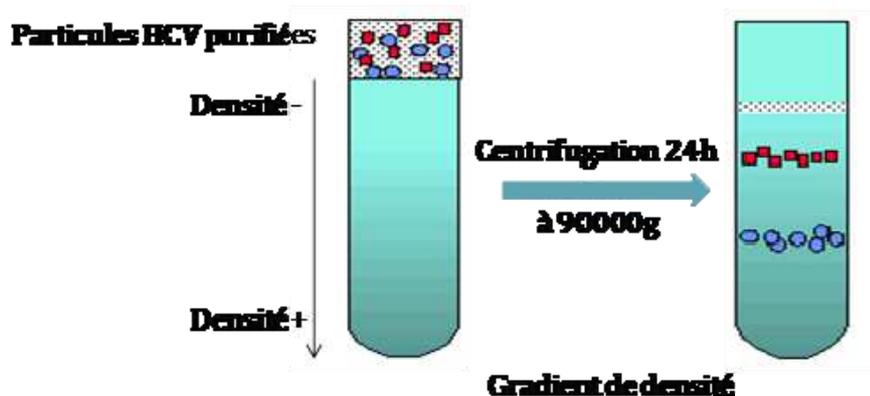


**Figure 34: Titration de l'activité antigénique E1E2 des particules virales.**

Les particules virales purifiées ont été analysées par ELISA à différentes dilutions (1/5 ; 1/10 ; 1/50 et 1/100). La réactivité E1E2 est étudiée en utilisant l'anticorps D32.10.

### **3.2. Propriétés physico-chimiques des particules HCV**

Nous avons ensuite étudié la distribution de la densité des particules virales en fonction de leur réactivité E1E2/D32.10 par ELISA et la détection de l'ARN viral par RT-PCR quantitative en gradient d'iodixanol (6 - 56% ; Optiprep) selon la technique décrite par Nielsen (**Figure 35**) [Nielsen et al., 2006] et en gradient de saccharose comme précédemment [Petit et al., 2005].



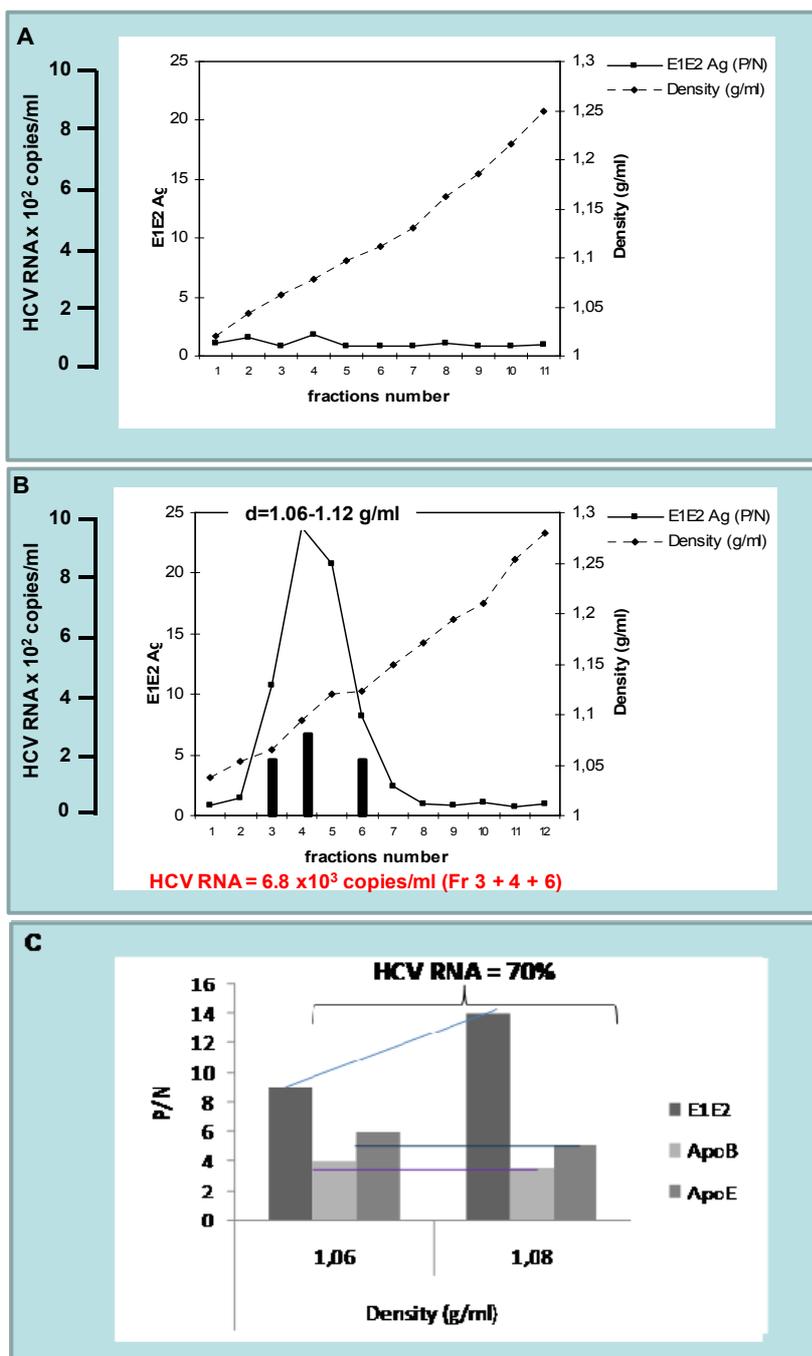
**Figure 35: Ultracentrifugation isopycnique en gradient d'iodixanol**

. Le culot enrichi en particules HCV est déposé sur un gradient d'iodixanol (6-56%). La densité des différentes fractions est déterminée par réfractométrie.

Une seule population virale de faible densité (1,06 - 1,12 g/ml) a été identifiée en gradient d'iodixanol et présente une forte réactivité E1E2 vis-à-vis de l'anticorps monoclonal D32.10 (**Figure 36B**). Cette activité antigénique E1E2 est observée dans les fractions 3 à 7 avec un maximum pour la fraction 4 (densité =1,08 g/ml) correspondant au pic d'ARN viral. Il existe une bonne corrélation entre l'activité antigénique E1E2 et la détection de l'ARN viral. Cette population HCV enveloppée positive pour E1E2 contient la majorité de l'ARN viral soit  $6,8 \times 10^3$  copies d'ARN viral/ml. Ces observations sont spécifiques aux particules virales puisque aucune activité antigénique E1E2, ni de détection d'ARN viral ne sont observées avec le surnageant de cellules non infectées préparé dans les mêmes conditions et utilisé comme témoin négatif (**Figure 36A**). Par contre en gradient de saccharose, cette population virale se retrouve à une densité comprise entre 1,17 et 1,20 g/ml. Ainsi, ces particules virales présentent des propriétés physico-chimiques identiques aux particules HCV circulantes comme précédemment montré [Petit et al., 2005].

L'analyse de l'ELISA des différentes fractions du gradient d'iodixanol pour la présence des apolipoprotéines B et E (ApoB et ApoE) révèle que ces particules virales enveloppées contenant de l'ARN viral (+) sont associées à l'ApoB et à l'ApoE et sédimentent entre 1,06 et 1,12 g/ml. Comme précédemment décrit [Nielsen et al., 2006], cette population de faible densité (1,08 g/ml) contient la majorité de l'ARN viral et nous montrons qu'elle exprime les protéines d'enveloppe E1E2 identifiées par l'AcMo D32.10 associées à l'ApoB et à l'ApoE (**Figure 36C**).

## ARTICLE 2

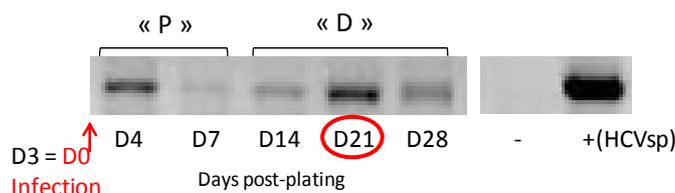


**Figure 36: Analyse des différentes populations virales.**

Les particules virales purifiées sont soumises à une ultracentrifugation isopycniqne en gradient d'iodixanol (B). La densité de chaque fraction est déterminée par réfractométrie. Ces fractions sont ensuite testées en ELISA avec l'anticorps monoclonal D32.10, l'anti-ApoB et l'anti-ApoE (C). L'ARN viral est quantifié par RT-PCR en temps réel. Le surnageant des cellules non infectées est préparé dans les mêmes conditions (ultracentrifugation successives) et utilisé comme témoin négatif (A).

### 3.3. Réinfection des cellules naïves

Les cellules HepaRG naïves ont été infectées à J3 post ensemencement avec du surnageant J21 de la première infection. Les résultats de RT-PCR représentés sur la **Figure 37** montrent une détection de l'ARN viral avec amplification du signal au début de la phase de différenciation avec un maximum à J21. Ces résultats suggèrent que les particules virales produites dans ce système sont infectieuses.

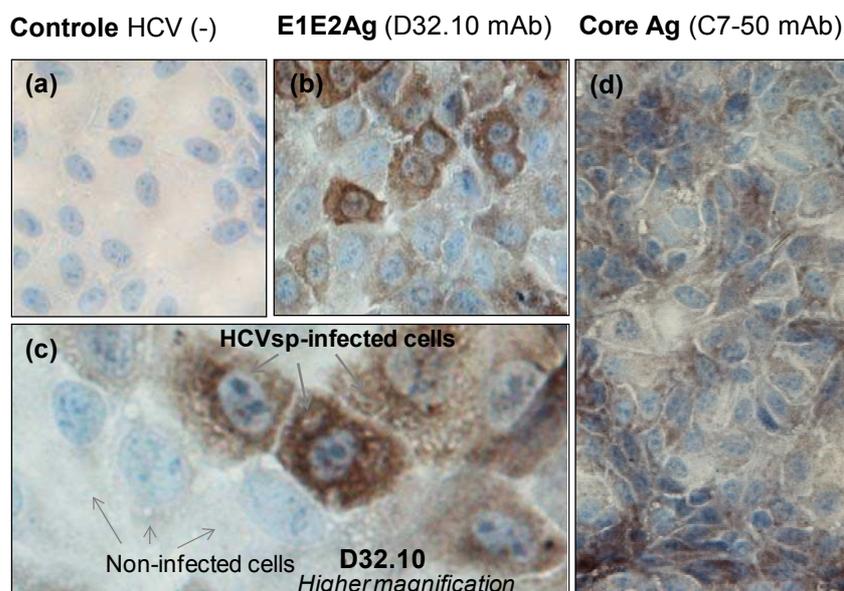


*Figure 37: Réinfection des cellules naïves*

#### 4) Détection des antigènes viraux dans les cellules HepaRG infectées

La présence des antigènes du HCV est analysée dans les cellules HepaRG à J28 post ensemencement en utilisant l'anticorps anti-E1E2/D32.10 qui a été montré capable de détecter les protéines d'enveloppe du HCV dans des biopsies de foie de patients cirrhotiques et tumorales [Galy et al., 2007] et l'anticorps anti-capside (C7.50, Abcam) pour la détection de l'antigène de capsid. Les résultats d'immunohistochimie montrent que les antigènes d'enveloppe E1E2 et de capsid du HCV s'accumulent dans le cytosol des cellules infectées avec un fort marquage (**Figure 38b, c, d**). Ce marquage cytoplasmique est spécifique puisque aucun marquage n'est observé dans les cellules non infectées (avec ou sans anticorps) servant de contrôle négatif (**a**). Un mois après la mise en culture (J28), environ 60% des cellules HepaRG seraient infectées et ce pourcentage diminue ensuite à J56 où 30% des cellules sont marquées. Tous ces résultats confirment l'infection des cellules HepaRG par les particules HCVsp et que l'AcMo D32.10 constitue un bon outil pour la détection des protéines E1E2 dans les cellules infectées.

## ARTICLE 2



**Figure 38: Localisation des antigènes viraux dans les cellules infectées.**

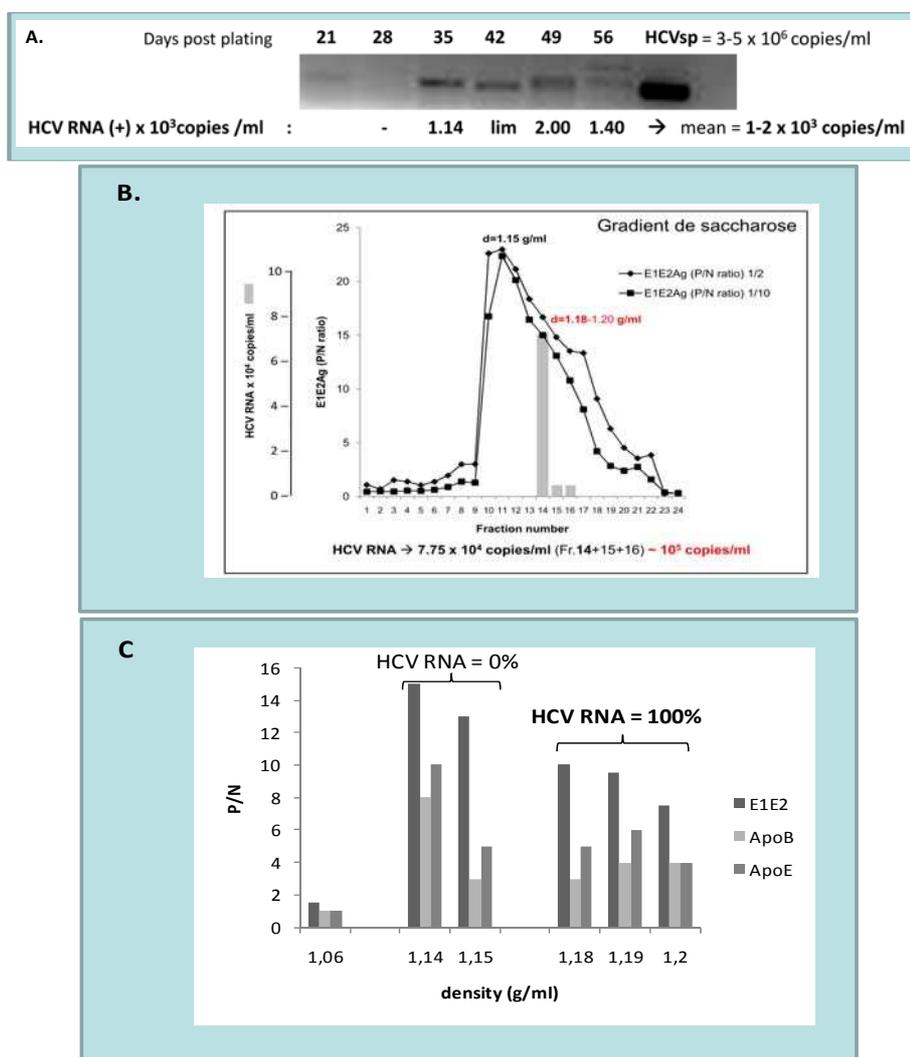
*L'anticorps anti-E1E2/D32.10 et l'anti-capside C7.50 sont utilisés en immunohistochimie pour détecter respectivement les protéines d'enveloppe E1E2 (b et c) et la capside du HCV (d). Les cellules non infectées sont utilisées comme contrôle négatif (a).*

### **5) Persistance de l'infection**

Les cellules HepaRG infectées (HCVsp-RG) ont été congelées à J56 puis remises en culture à faible densité. Après un ou trois repiquages (P1 et P3), le processus de différenciation a été induit et la production de particules enveloppées E1E2 positives et contenant de l'ARN viral recherchée (**Figure 39**). L'ARN viral a été détecté puis quantifié par RT-PCR en temps réel entre J35 et J56 post-ensemencement après 3 repiquages (P3) et induction de la phase de différenciation. Dans ces conditions, le taux d'ARN du HCV est compris entre 1 et 2 x 10<sup>3</sup> copies/ml (**Figure 39A**). Nous avons noté que ce taux d'ARN viral détecté est moins important après 3 repiquages qu'après un seul repiquage avant l'induction de la différenciation. Ceci suggère que les cellules HepaRG sont chroniquement infectées avec persistance de l'infection. Les culots des surnageants correspondant aux P1 et P3 ont ensuite été soumis à une ultracentrifugation isopycnique en gradient de saccharose (10-60%). L'analyse des résultats de l'ELISA des différentes fractions montrent une forte activité antigénique E1E2 aux densités comprises entre 1,15 et 1,20g/ml (**B**). En fonction de la présence ou de l'absence d'ARN viral, nous avons subdivisé cette population virale en deux sous populations. Une

## ARTICLE 2

première population correspondant aux fractions 11 et 12 et qui sédimente à 1,14 - 1,15 g/ml. Ces particules virales expriment plus de protéines d'enveloppe à leur surface associées à la majorité de l'ApoB/E (C) mais elles ne contiennent pas d'ARN viral. De ce fait, ces virions identifiés correspondent vraisemblablement aux particules enveloppées vides. Par contre, la seconde sous-population virale (fractions 14, 15 et 16) contient jusqu'à  $10^5$  copies d'ARN du HCV /ml et présente une activité antigénique E1E2 et une expression d'apolipoprotéines B et E moins importantes. Ces particules virales complètes qui sédimentent à une densité comprise entre 1,18 et 1,20 g/ml seraient potentiellement infectieuses.



**Figure 39: Caractéristiques des particules provenant des cellules chroniquement infectées (HCVsp-RG).**

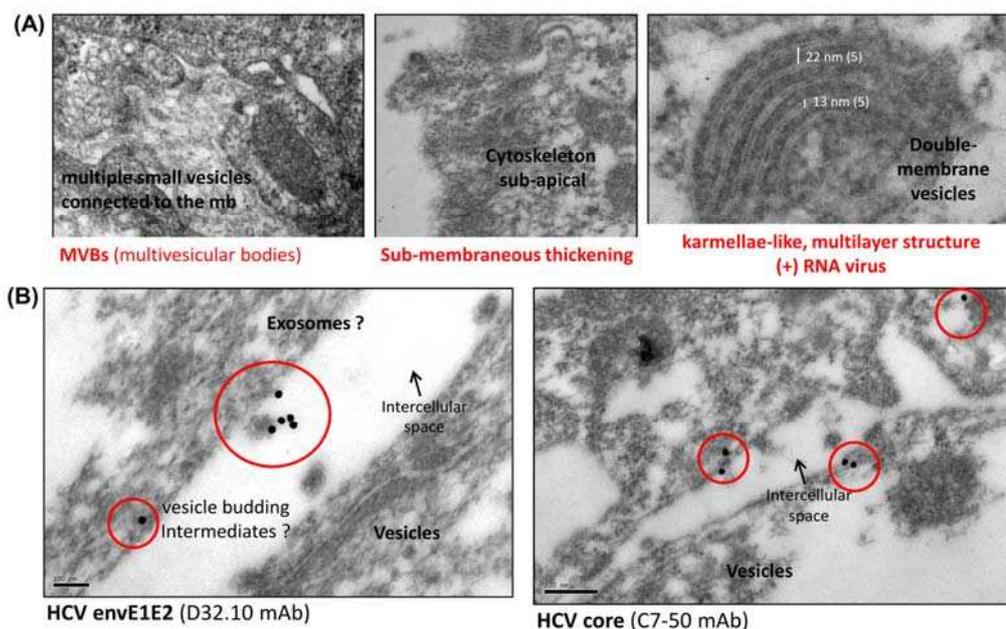
## ARTICLE 2

*L'ARN viral est détecté puis quantifié par RT-PCR en temps réel (A). Les particules HCV purifiées sont soumises à une ultracentrifugation sur gradient de saccharose (B). Les fractions sont analysées par ELISA avec l'AcMo D32.10 et l'anti-ApoB et l'anti-ApoE(C).*

### **6) Etudes morphologiques des cellules infectées**

Par microscopie électronique et marquage à l'or, des études morphologiques (A) et de localisation intra-cellulaire des antigènes E1E2 et capsid (B) ont été réalisées sur les cellules infectées de façon persistante (HCVsp-RG) comparativement aux cellules non infectées. Ainsi en microscopie électronique, les cellules infectées présentent des altérations morphologiques visualisées sur la **Figure 40** avec la présence de corps multivésiculaires associés à la membrane et un épaissement sous membranaire du cytosquelette au pôle apical. De plus, des structures multi lamellaires successives et régulières (22 nm) provenant de la membrane du réticulum endoplasmique ont été observées dans les cellules infectées. Ces réarrangements membranaires ont été retrouvés associés à la réplication des virus à ARN [Schwartz et al., 2004]. Nous avons également noté la présence de corps apoptotiques dans certaines de ces cellules infectées de manière chronique.

L'étude de la localisation cellulaire des antigènes viraux a été réalisée par une approche d'immunomarquage à l'or en ME en utilisant les anticorps monoclonaux D32.10 et C7.50 (Abcam) pour détecter respectivement les protéines d'enveloppe et de capsid du HCV. L'expression des antigènes E1E2 et de la capsid dans les cellules HCVsp-RG est observée avec une localisation sous-membranaire, membranaire et très souvent associée à des vésicules ressemblant à des exosomes. L'épitope E1E2 reconnu par l'AcMo D32.10 est exprimé dans les cellules infectées. Ces observations suggèrent un possible bourgeonnement des virions *via* les exosomes puisqu'il a été montré qu'il existe une association des protéines d'enveloppe E1E2 du HCV avec des exosomes [Masciopinto et al., 2004]

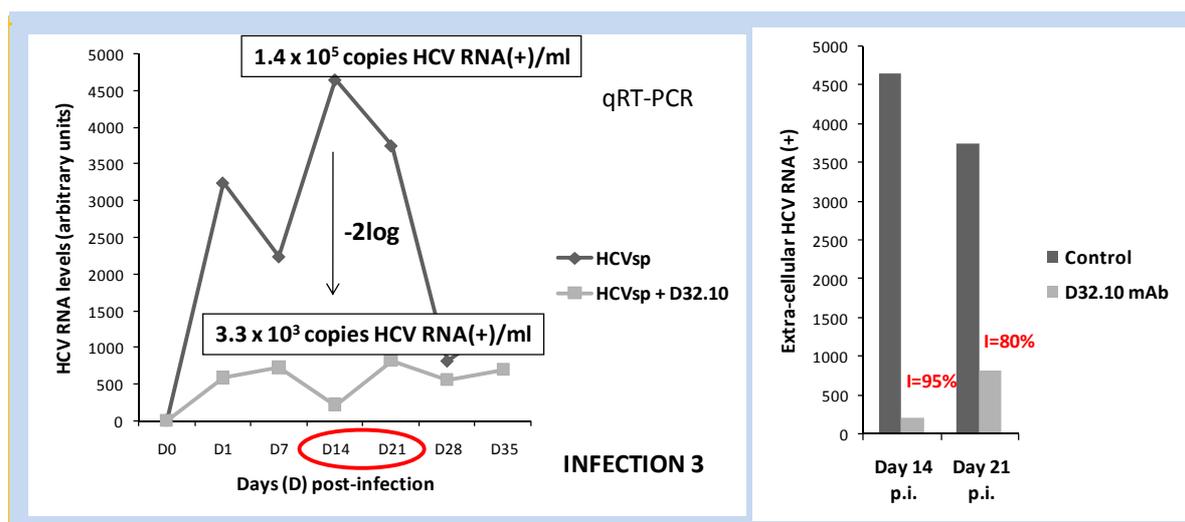


**Figure 40: Etude morphologique et localisation intra-cellulaire des antigènes viraux dans les cellules infectées**

L'analyse par microscopie électronique a permis d'observer les modifications morphologiques au niveau des cellules infectées. L'analyse de la localisation subcellulaire des antigènes viraux a été réalisée en utilisant les anticorps anti-E1E2/D32.10 et anti-core/C7-50.

## 7) Inhibition de l'infection par l'anticorps monoclonal anti-E1E2/D32.10

Enfin, nous avons testé l'activité inhibitrice du D32.10 dans ce système d'infection *in vitro* fonctionnel des cellules HepaRG par les particules HCVsp. Ainsi, l'anticorps monoclonal anti-E1E2 a été utilisé dans ces expériences d'inhibition de l'infection à une concentration égale à 0,5 µg/ml correspondant à l'IC50 de l'anticorps déterminée dans nos études d'inhibition du *cell-binding* [Ndongo et al., 2009]. Des études préliminaires montrent une inhibition quasi-totale de l'infection des cellules HepaRG par l'anticorps D32.10 jusqu'à 95 % d'inhibition à J14 et 80 % à J21 post ensemencement (**Figure 41**). Cet effet inhibiteur s'observe précocement suggérant une action de l'anticorps aux stades précoces, d'attachement et d'entrée du virus qui impliqueraient l'épitope E1E2 reconnu par l'AcMo D32.10 comme précédemment montré [Ndongo et al., 2009].



**Figure 41: Inhibition de l'infection par l'anticorps monoclonal D32.10.**

L'ARN viral est détecté par RT-PCR classique puis quantifié par RT-PCR en temps réel exprimé en nombres de copies/ml.

En conclusion, nous avons montré pour la première fois que les cellules HepaRG qui expriment les récepteurs potentiels du HCV sont infectables au stade prolifératif avec une production d'ARN viral sous forme particulière infectieux associé aux protéines d'enveloppe et aux apolipoprotéines B et E au stade différencié. L'épitope E1E2 reconnu par l'AcMo D32.10 a été montré exprimé dans les cellules HepaRG infectées. De plus, ces cellules HepaRG sont infectées de façon persistante. A ce stade, elles présentent de nombreuses modifications morphologiques associées à une réplication virale des virus à ARN. Dans ce système, l'AcMo D32.10 est capable d'inhiber fortement les étapes précoces du cycle viral, vraisemblablement au niveau de l'attachement et de l'entrée du virus dans la cellule (**Figure 42**).

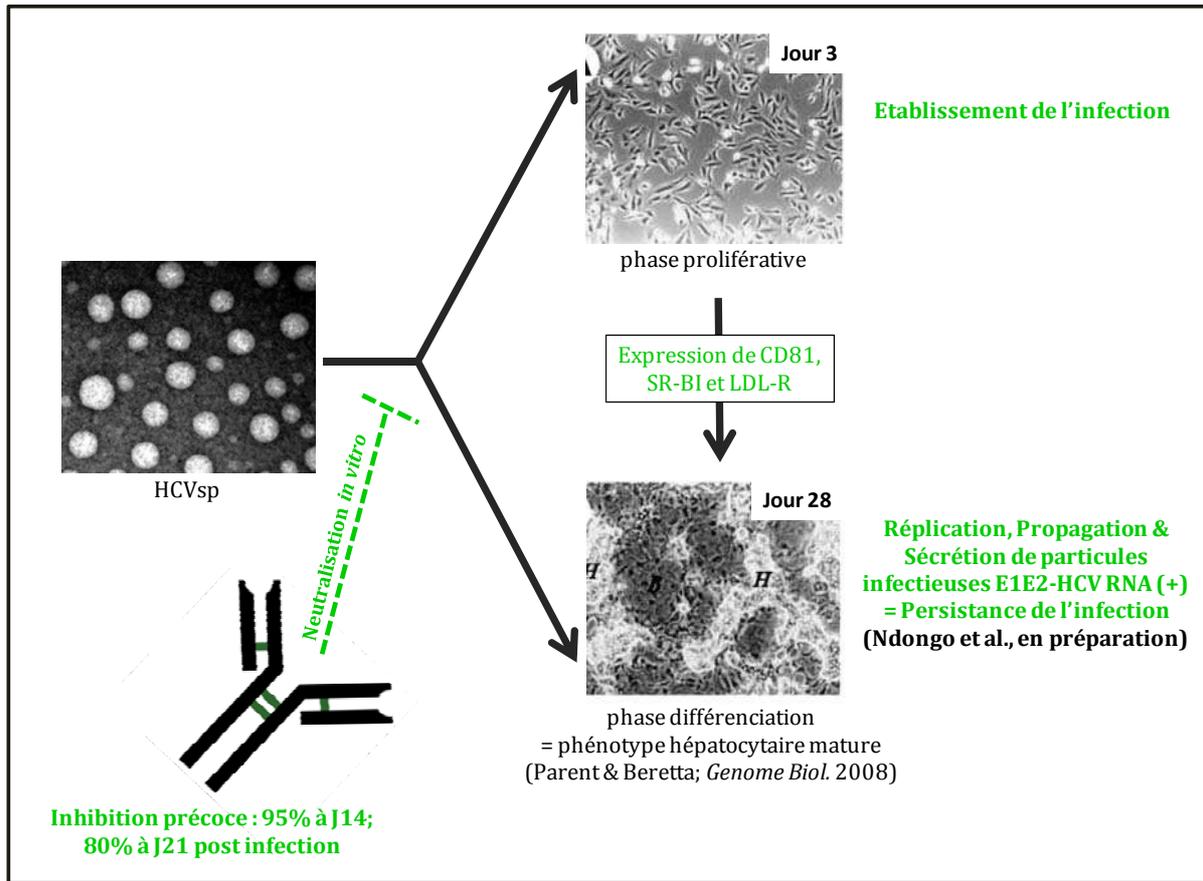


Figure 42 : Infection des cellules HepaRG par les particules HCVsp : inhibition par l'anticorps anti-E1E2/D32.10



**3. ARTICLE 3 - EXPRESSION DE E1E2 SUR LES PARTICULES  
LIBEREES A PARTIR DE CULTURE PRIMAIRES D'HEPATOCYTES  
PROVENANT DE FOIE DE PATIENTS CIRRHOTIQUES**

**Expression of E1E2 on hepatitis C RNA-containing particles released from primary  
cultured human hepatocytes derived from infected cirrhotic livers**

Ndiémé Ndongo, Subjini Selliah, Pascale Berthillon, Valérie-Ann Raymond,  
Christian Trépo, Marc Bilodeau et Marie-Anne Petit

*Intervirology* (en révision)



### ARTICLE 3

Dans la troisième étude, nous avons recherché l'expression de l'épitope E1E2/D32.10 sur les particules HCV dérivées de foies de patients infectés par le HCV (HCV-lp) et analysé leurs propriétés physico-chimiques. Pour cela, des hépatocytes humains provenant de biopsies chirurgicales de foie ont été isolés puis cultivés. Ce travail a été rendu possible grâce à une collaboration avec Dr Marc BILODEAU du Service d'Hépatologie Cellulaire du CHU-Hôpital Saint-Luc de Montréal.

Après deux jours de culture, les surnageants ont été collectés et les particules HCV-lp secrétées à partir de ces cultures primaires d'hépatocytes humains ont été purifiées par des étapes successives d'ultracentrifugation. Ainsi, trois préparations virales (VP) ont été obtenues provenant de trois patients différents, 2 de génotype 1b (VP1 et VP2) et un de génotype 2b (VP3). Les trois VPs ont été analysées en terme de quantification de l'ARN viral. Elles contiennent de  $2 \times 10^6$  à  $3,7 \times 10^7$  copies d'ARN du HCV/ml correspondant à une activité spécifique d'environ  $10^6$  à  $10^7$  copies /mg de protéine (**Table 1**). L'activité antigénique d'enveloppe E1E2 de VP1, VP2 et VP3 a été analysée par ELISA en utilisant l'anticorps monoclonal D32.10. Cette réactivité E1E2 proportionnelle à la concentration en protéine présente une limite de dilution d'environ 10 µg/ml pour VP1 et  $\leq 5$  µg/ml pour VP2 et VP3 (**Figure 1A**). L'expression des protéines d'enveloppe du HCV a été également analysée par une approche western blot. Les protéines E1 (31kDa) et E2 (60-68 kDa) ont été détectées fortement dans les trois préparations virales (**Figure 1B**). Nous avons observé une bonne corrélation entre les résultats obtenus par les techniques d'ELISA et de western blot (VP1<VP2<VP3) ainsi qu'entre la réactivité E1E2 et la quantification de l'ARN du HCV. Nous avons confirmé que l'anticorps D32.10 était capable de détecter aussi bien les protéines E1 et E2 de génotype 2 que celles de génotype 1. L'expression de l'antigène de capsid a aussi été analysée par western blot en utilisant un anticorps polyclonal commercial anti-core (C3, USBiological) (**Figure 1C**). La protéine de capsid est clairement détectée sous forme monomérique à 25 kDa dans la VP2 associée à des formes multimériques (50, 75 et 150 kDa). Ces multimères de 25 kDa sont également observés dans VP3 (50 kDa) et VP1 (75 kDa) mais la forme monomérique est faiblement détectée dans la VP3 et absente dans la VP1. Ces résultats déjà observés dans les particules HCVsp confirment une grande hétérogénéité moléculaire de la protéine de capsid. Ainsi, nous avons montré que les

### ARTICLE 3

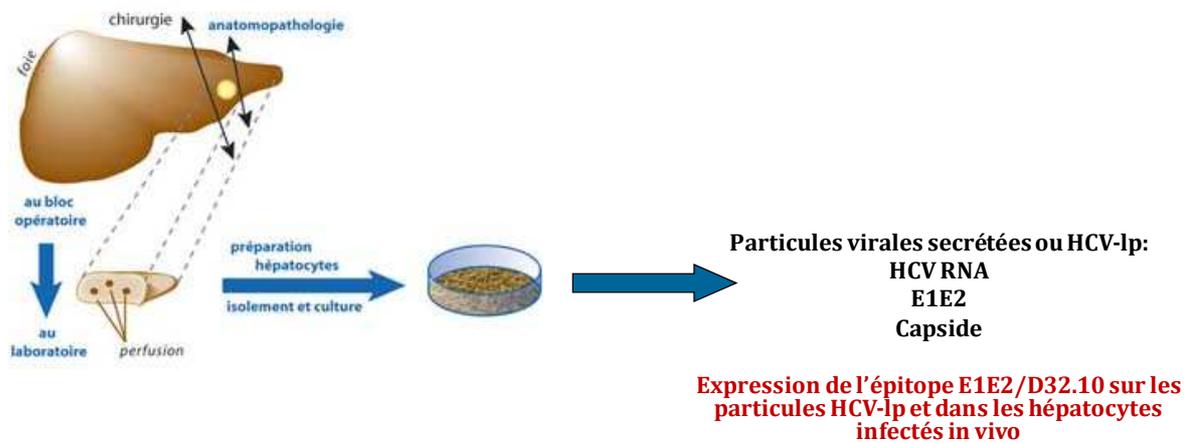
HCV-lp (VP1, VP2 et VP3) contiennent l'ARN viral, des protéines de capsid et expriment à leur surface les protéines E1, E2 détectées par l'AcMo D32.10.

Sur le plan physico-chimique, nous avons séparé les différentes sous populations virales en fonction de leur densité après sédimentation par ultracentrifugation sur gradient de saccharose (10 à 60%). Nous avons ainsi identifié une population majoritaire qui sédimente à une densité comprise entre 1,15 et 1,25 g/ml pour les 3 VPs (**Figure 2A, B et C**). Cette population contient  $2 \times 10^5$  copies d'ARN/ml pour VP1 (fractions 11 et 12),  $3,8 \times 10^4$  pour la VP2 (fraction 12) et  $3,3 \times 10^4$  copies/ml pour la VP3 (fraction 11). L'expression des protéines d'enveloppe E1 et E2 a également été analysée en ELISA et en western blot avec l'anticorps anti-E1E2/D32.10. En conditions réductrices (R), les formes monomériques de E1 et E2 sont détectées dans les fractions correspondant au pic en ELISA. En conditions non réductrices (NR), seules des bandes  $\geq 200$  kDa sont détectées qui correspondent aux formes homo-hétérodimériques des complexes E1E2 comme observé avec les particules HCVsp. Ces résultats montrent qu'il existe une étroite corrélation entre la détection maximale des complexes d'enveloppe E1E2 et la présence d'ARN viral. Ainsi, les particules HCV dérivées de foie de patients cirrhotiques qui contiennent l'ARN du HCV, expriment l'épitope E1E2/D32.10 et sédimentent à 1,15-1,25 g/ml en gradient de saccharose. Ces signaux sont bien spécifiques des particules HCV puisque l'ARN viral en RT-PCR quantitative et l'activité antigénique E1E2 en ELISA sont négatifs sur une préparation obtenue dans les mêmes conditions à partir d'un foie non infecté (**Figure 2D**).

Enfin, nous avons étudié l'expression des antigènes viraux dans les hépatocytes humains infectés en immunohistochimie. Pour cela nous avons utilisé les anticorps monoclonaux anti-E1E2/D32.10, anti-E2/D4.12.9, obtenus par immunisation avec des particules HCV sériques (HCVsp) et un anticorps polyclonal anti-capsid commercial (clone 11-B3, C8A216M, Biodesign International). Ainsi, en présence des anticorps D32.10 et D4.12.9, nous avons observé un fort marquage avec une localisation cytoplasmique avec la préparation virale VP2 de génotype 1b (**Figure 3B, C**). Des résultats similaires ont été obtenus avec des hépatocytes primaires de génotype 2b correspondant à VP3. Ces observations démontrent une expression à la fois des épitopes E1E2 et E2 reconnus par ces deux anticorps dans les hépatocytes infectés par le HCV provenant de patients cirrhotiques. L'antigène de capsid a également été détecté dans les hépatocytes

### ARTICLE 3

humains infectés par le HCV de génotype 1b avec la même localisation cytoplasmique (**Figure 3D**). Cependant, l'anticorps utilisé dans ces expériences ne reconnaît pas l'antigène de capsid du HCV de génotype 2. Aucun marquage n'est observé dans des hépatocytes humains provenant de foie de patient non infecté avec des immunoglobulines irrelevantes (**Figure 3A**). Ces résultats montrent que l'épitope E1E2 reconnu par l'anticorps D32.10 est exprimé parallèlement à l'antigène E2 et à la capsid dans le cytoplasme des hépatocytes infectés (**Figure 43**).



L'anticorps anti-E1E2 /D32.10 (et anti-E2/D4.12.9) = Outil de détection des antigènes d'enveloppe E1E2 du HCV

*Figure 43: Caractéristique des particules HCV-Ip*



**Expression of E1E2 on hepatitis C RNA-containing particles released from primary cultured human hepatocytes derived from infected cirrhotic livers**

Ndiémé Ndongo<sup>a,b</sup> Subjini Selliah<sup>d</sup> Pascale Berthillon<sup>a,b</sup> Valérie-Ann Raymond<sup>d</sup>  
Christian Trépo<sup>a,b,c</sup> Marc Bilodeau<sup>d</sup> Marie-Anne Petit<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>INSERM, U871, 151 Cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, <sup>b</sup>Université Lyon 1, IFR62 Lyon-Est, 69008 Lyon, <sup>c</sup>Hospices Civils de Lyon, Hôtel Dieu, Service d'Hépatologie, 69002 Lyon, France, and <sup>d</sup>Centre de Recherche du CHUM-Hopital Saint-Luc, Laboratoire d'Hépatologie cellulaire, Montréal, Canada

\* **Corresponding author** : Marie-Anne Petit, INSERM, U871. 151, Cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03 (France). Phone : +33 (0)4 72 68 19 58. Fax +33 (0)4 72 68 19 71. E-Mail : marie-anne.petit@inserm.fr

**Short title:** Expression of E1E2 on HCV RNA particles derived from infected cirrhotic livers.

**Key words:** Cirrhotic liver • E1E2 glycoproteins • Hepatitis C virus • Infection • Monoclonal antibody • Primary cultured human hepatocytes

**Abstract**

**Objective:** To determine whether liver-derived hepatitis C RNA-containing particles express the E1E2 discontinuous antigenic determinant defined by unique monoclonal antibody (mAb) D32.10 which recognizes three highly conserved segments in E1 (aa297-306) and E2 (aa480-494 and aa613-621) envelope glycoproteins. **Methods:** Human hepatocytes were isolated from HCV-infected cirrhotic explanted livers. The liver-derived HCV particles (so-called HCV-Ip) released from 3 distinct cultures (genotypes 1b and 2b) were characterized. HCV RNA(+) was quantified by real time-RT-PCR. The E1E2 antigenic activity was assessed by indirect ELISA and immunoblotting using D32.10. The density distributions of HCV RNA and E1E2 antigen were determined by isopycnic sucrose density gradients. HCV E1E2, E2 and core antigens were detected in the cells by immunochemical staining. **Results:** HCV-Ip contained HCV RNA ( $10^6$  to  $10^7$  copies/mg of protein) and core proteins and expressed the E1E2/D32.10 epitope. HCV RNA and E1E2 co-sedimented between 1.15 and 1.25 g/ml in sucrose gradients. Moreover, the mAb D32.10 detected E1E2 by immunostaining in HCV-infected hepatocytes in parallel with E2 and core antigens. **Conclusion:** Our results provide evidence that the mAb D32.10 recognizes E1E2 envelope complexes expressed in the cell cytoplasm and on the surface of HCV RNA-containing particles released from short-term cultures of *in vivo*-infected hepatocytes.

## Introduction

Hepatitis C Virus (HCV) is a positive strand RNA virus that belongs to the genus Hepacivirus of the *Flaviviridae* family. This virus exhibits a narrow host (humans and chimpanzees) and tissue (hepatocytes) tropism. HCV is the most common blood-borne virus which causes chronic infections in approximately 170 million people in the world. Chronic hepatitis may progress to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Current therapies are limited and only effective in 50% of infected patients depending of genotype. A vaccine to prevent HCV infection is not yet available [for review, 1]. The development of potential new antiviral therapies and a vaccine has been hampered by the difficulties to infect primary cultures of human hepatocytes by HCV-positive serum [2, 3].

In the last decade, significant progress has been made with the development of several HCV models: HCV-like particles (HCV-LPs) produced in insect cells [4], HCV pseudotyped particles (HCVpp) displaying E1 and E2 glycoproteins onto retroviral and lentiviral core particles [5], and cell-culture grown HCV (HCVcc) obtained after transfection of a unique HCV genotype 2a complete replicon (JFH-1) into Huh-7 or Huh7-derived hepatoma cells [6, 7, 8]. However, despite its strong advantages, the HCVcc model tightly depends on the JFH-1 non-structural genes (replicase complex) of genotype 2a and the poor innate immune response characteristic of immortalized Huh-7 or Huh-7-derived cells [9].

We have recently reported the feasibility of primary cultures of HCV-infected human hepatocytes from cirrhotic livers removed at transplantation, and demonstrated that the morphological and functional properties of this system provide unique opportunities for studying HCV infection [10]. Moreover, we have previously characterized -for the first time- enveloped HCV particles in the serum of chronic hepatitis C patients, so-called HCVsp [11], thanks to unique monoclonal antibody (mAb) D32.10 which recognizes a highly conserved discontinuous antigenic determinant (E1:297-306, E2:480-494 and E2:613-621) expressed on the surface of HCVsp from the main genotypes: 1a, 1b, 2a and 3a [12]. The availability of such systems prompted us to characterize the HCV RNA-containing particles released by primary cultures derived from *in vivo* HCV-infected cirrhotic human hepatocytes.

## Materials and methods

### *Isolation and culture of in vivo HCV-infected human hepatocytes*

HCV-infected human hepatocytes were isolated as previously described [10] from liver surgical biopsies of 3 different cirrhotic patients (informed consent was obtained from patients): two of genotype 1b (P1 and P2) and one of genotype 2b (P3). Cells were seeded at a density of 50,000 cells/cm<sup>2</sup> in William's E medium containing 10% foetal bovine serum (FBS from Gibco BRL, Burlington, ON). After 4h, the medium was replaced by fresh medium containing 10% human serum from HCV-negative donors, 4.5 x 10<sup>-5</sup> M hydrocortisone and 1% dimethyl-sulfoxide (DMSO). The supernatants collected from day 2 to day 7 after plating, were clarified by centrifugation for 10 min at 20,000 g and stored at -80°C.

### *Purification of HCV particles by successive ultracentrifugation steps*

HCV particles from the 3 distinct liver cultures (P1, P2 and P3) were semi-purified from 50 ml of supernatants by two sequential ultracentrifugations at 210.000g for 4 h at 4°C in order to eliminate the cell culture medium as previously described [11]. The final HCV-enriched pellets (called VP1, VP2 and VP3, respectively) were resuspended in 1–2 ml of TNE buffer (20 mM Tris–HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) and stored at -80°C as small aliquots. Protein concentration was determined by BCA protein assay (Sigma Aldrich, Germany).

### *Sedimentation analysis: buoyant density determination in sucrose gradients*

To study the physicochemical properties of liver-derived HCV particles, each purified viral preparation (VP1, VP2 or VP3) was subjected to isopycnic centrifugation (200,000 × g for 48 h at 4°C) in a sucrose density gradient (10 to 60% w/w) in the SW41 rotor of a Beckman centrifuge. Fractions (0.6 ml) were collected from the bottom of the tube and the density of each was determined by refractometry. HCV-RNA content was assessed by branched DNA (b-DNA) technique and E1E2 antigenic reactivity analysed by ELISA and Western blotting using the mAb D32.10.

## ARTICLE 3

### *HCV RNA Quantification*

The quantification of HCV RNA in each of different viral preparations (VP1, VP2 or VP3) as well as in the fractions from 3 distinct sucrose gradients was performed using the third generation of the b-DNA nucleic acid probe test (Bayer's VERSANT HCV RNA 3.0 Assay). The assay required a sample volume of 50  $\mu$ l. The lower and upper detection limits were  $2.5 \times 10^3$  and  $4.0 \times 10^7$  copies/ml, respectively, as mentioned by the manufacturer. The final detection was performed in a semiautomated Bayer System 340 bDNA analyzer.

### *E1E2 antigenic titration by indirect ELISA*

E1E2 antigenic activity was determined as previously described [12]. Polyvinyl plates (Maxisorb, Nunc) were coated with the HCV final pellets VP1, VP2 or VP3 (from 6.25 to 200  $\mu$ g of protein/ml) or the fractions from sucrose gradients (dilution 1/5). The saturation was performed with TNB (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 100 mM NaCl) containing 5% bovine serum albumin (BSA). After 4 washings with TNB, the anti-E1E2/D32.10 mAb (5 $\mu$ g/ml) was added and incubated at 37°C for 2 h. The bound antibody was then detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse immunoglobulins (1/5,000 Immunotech), and orthophenylenediamine (OPD) as substrate. The reaction was stopped by adding HCl 2N and the optical density (O.D.) was read at 490 nm. The results were considered as positive (P) when superior to the cutoff, corresponding to the mean of negative (N) controls multiplied by 2.1, i.e. P/N ratio > 2.1.

### *Western blot analysis*

HCV envelope (E1 and E2) and core proteins were detected by immunoblotting using the mAb D32.10 [12] and rabbit polyclonal anti-core antibodies (C3, USBiological), respectively. Six  $\mu$ g of protein of each final HCV-enriched pellet (VP1, VP2 or VP3) and 10  $\mu$ g of different fractions from sucrose gradients were applied for the E1E2 detection. Fifty  $\mu$ g of protein of VP1, VP2 or VP3 were used to detect the core proteins. SDS-PAGE on 10% gel was performed under non-reducing and reducing conditions (2% SDS  $\pm$  5% 2  $\beta$ -mercaptoethanol) [11,12]. After protein transfer onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, the mAb D32.10 (5  $\mu$ g/ml) or C3 polyclonal antibodies (1 $\mu$ g/ml) diluted in 50% normal human serum (NHS) were added as primary antibodies. In the revelation phase, HRP-conjugated anti-mouse (1/5,000 Immunotech) or anti-rabbit (1/10,000 Immunotech) IgG F(ab')<sub>2</sub> fragments were used and the blots were revealed with an enhanced chemiluminescence detection system (ECL Plus system, Amersham Biosciences).

## ARTICLE 3

### *Immunohistochemistry (IHC)*

Hepatocytes isolated from two normal livers as negative controls (HCV-) and from two HCV-infected cirrhotic livers (HCV+) corresponding to VP2 (genotype 1b) and VP3 (genotype 2b) were used for IHC. Cells were seeded at a density of 50,000 cells/cm<sup>2</sup> and grown in 4-well chamber slides (LaB-Tek, Brands Products). At Day 3, cells were fixed with paraformaldehyde (2% PFA in PBS) for 15 minutes at room temperature, washed 3-fold with PBS and stored at -80°C until use. Immunostaining was performed using the Dakocytomation Envision dual link system HRP kit (Dako, Denmark). After permeabilization of cells with 0.1% saponine in PBS for 30 min at room temperature, and incubation with endogenous enzyme block for 10 min at room temperature, cells were incubated for 30 min with primary antibodies: the anti-E1E2/D32.10 mAb (2.5 µg/ml) or the anti-E2/D4.12.9 mAb (1µg/ml) or mAb to HCV core antigen (clone 11-B3, C8A216M, Biodesign International) (20 µg/ml). Revelation was then performed by incubation with 3,3'-diaminobenzidine (DAB+) substrate-chromogen for 5-10 min. The brown-colored precipitate at the antigen site was observed by light microscopy.

## **Results**

### *Expression of the E1E2/D32.10 epitope on the HCV RNA-containing particles released by human hepatocytes derived from HCV-infected cirrhotic livers*

HCV particles released from primary cultures of human hepatocytes were semi-purified by sequential ultracentrifugation from supernatants collected Day 3 post-seeding. Like that, cellular material (debris) and proteins present in the culture medium were removed and the pellet subjected to analysis represented HCV particle-enriched material. Three viral preparations (VP) were obtained from three different patients: two of genotype 1b (VP1 and VP2) and one of genotype 2b (VP3). Their protein concentration was comprised between 2 and 9.3 mg/ml, and their HCV RNA content between  $2 \times 10^6$  and  $3.7 \times 10^7$  copies/ml (or  $4 \times 10^5$  and  $7 \times 10^6$  IU/ml), corresponding to around  $10^6$  to  $10^7$  copies of HCV RNA per mg of protein (Table 1).

The HCV E1E2 antigenic activity of VP1, VP2 and VP3 was analyzed by indirect ELISA. The titration curve was established between 6.25 µg to 200 µg of protein per ml (Fig. 1A). The E1E2 reactivity decreased linearly from 200 µg/ml to 12.5 µg/ml. VP3 seemed to exhibit the strongest E1E2 reactivity. The limit of positivity was around 10 µg/ml for VP1 and  $\leq 5$  µg/ml for VP2 and VP3, which corresponded to  $1-5 \times 10^4$

### ARTICLE 3

copies of HCV RNA. To confirm the expression of E1 and E2 glycoproteins, VP1, VP2 and VP3 were subjected to SDS-PAGE and Western blot using the mAb D32.10. As shown in Fig. 1B, both E1 (31 kDa) and E2 (60-68 kDa) proteins were clearly detected in the three HCV preparations. We noticed that there is good correlation between ELISA and western blot techniques for the detection of E1E2 antigen (VP1<VP2<VP3), and more interesting between the E1E2 reactivity and the HCV RNA content (Table 1). In addition, these results confirm that D32.10 detected the E1 and E2 proteins present in HCV particles obtained from genotype 2 as well as genotype 1 samples [11, 12]. In order to determine whether these HCV particles contained core proteins, Western blot analysis was performed using rabbit polyclonal anti-core antibodies C3. As shown in Fig. 1C, the monomeric HCV core protein of 25 kDa was only faintly detected in VP3 and not detectable in VP1, while a band at 50 kDa was clearly observed in VP3, and a strong reactivity was visualized at 75 kDa in VP1. Thus, it was difficult to conclude that these secreted particles contained core. In contrast, VP2 clearly expressed the HCV core protein of 25 kDa, as well as oligomeric forms at 50, 75 and 150 kDa, as already described for serum-derived HCV particles [HCVsp, 11]. This confirms a great molecular heterogeneity of core proteins even under reducing conditions in liver-derived HCV particles, as in HCVsp [11]. These results strongly suggest that VP2 corresponds to complete HCV virions released from infected hepatocytes in culture supernatant.

The density distribution of liver-derived HCV particles (VP1, VP2 and VP3) was then analyzed by isopycnic centrifugation in a sucrose density gradient (10% to 60%) (Fig. 2A, B and C, respectively). For VP1 (Fig 2A, panel a), one major E1E2/D32.10-positive population with a density between 1.15-1.25 g/ml was observed with a peak of HCV RNA in fractions 11 and 12 containing  $1.4 \times 10^5$  and  $3.3 \times 10^4$  copies/ml, respectively, i.e. approximately  $2 \times 10^5$  copies of HCV RNA/ml in both fractions. For VP2 (Fig. 2B, panel a) and VP3 (Fig. 2C, panel a), a narrow E1E2/D32.10 peak was observed between 1.15-1.21 g/ml and 1.15-1.18 g/ml, respectively. The fraction 12 (VP2, Fig. 2B, panel a) and the fraction 11 (VP3, Fig. 2C, panel a) contained  $3.8 \times 10^4$  and  $3.3 \times 10^4$  copies of HCV RNA/ml, respectively. Selected fractions from sucrose gradients for each viral preparation (VP1, VP2 or VP3) were analysed by immunoblotting using the mAb D32.10 under non reducing (NR) and reducing (R) conditions (Fig. 2A, B and C, panels b). In R conditions (lower panels b), the monomeric forms of E1 and E2 glycoproteins were maximally detected in fractions 11 and 12 for VP1 (Fig. 2A, panel b), 11, 12 and 13 for VP2 (Fig. 2B, panel b), and 10 and 11 for VP3 (Fig. 2C, panel b), corresponding to peaks in ELISA (Fig. 2A, B and C, panels a). In NR conditions, only high molecular weight (HMW) bands ( $\geq 200$  kDa) were observed, likely representing homo-heterodimeric forms

### ARTICLE 3

of disulfide-bonded E1E2 envelope complexes (Fig. 2A, B, C, higher panels b). In Fig. A, panel b, HCV-enriched pellet before sedimentation analysis was included as positive control in the first lane. There is still a good correlation between the maximal detection of E1E2 envelope complexes and the presence of HCV RNA. All these signals are specific for HCV since no significant signal for both E1E2 in ELISA (P/N < 2.1, Fig. 2D) and HCV RNA in real time RT-PCR (< 10 copies/ml, not shown) was detected all along the gradient when HCV-negative control preparation was analysed in parallel. These results show that the HCV RNA-positive population released by human hepatocytes derived from HCV-infected cirrhotic livers (or HCV-1p) expresses the E1E2 epitope defined by the mAb D32.10 and sediments at a density of 1.15 to 1.25 g/ml in a sucrose density gradient.

#### *Expression of the E1E2/D32.10 epitope together with E2 and core antigens in primary cultured HCV-infected hepatocytes*

In control HCV(-) hepatocytes (Fig. 3A, B, C and D, panels a), no or very low background was observed in the absence (Control, Fig. 3A) as well as in the presence of relevant primary antibodies (anti-E1E2/D32.10, Fig. 3B; anti-E2/D4.12.9, Fig. 3C and anti-core, Fig. 3D), even if some differences in brightness/contrast in the images could be observed. The results presented in Fig. 3A, B, C and D, panels b were obtained with hepatocytes derived from the HCV-infected cirrhotic liver (HCV+) corresponding to VP2 of genotype 1b. A very strong specific staining with a cytoplasmic localization was observed in the presence of either the mAb D32.10 (Fig. 3B, panel b) or the mAb D4.12.9 (Fig. 3C, panel b). This demonstrates the expression of both E1E2 and E2 epitopes defined by each of these mAbs in HCV-infected hepatocytes from cirrhotic patients. Similar results for E1E2 (mAb D32.10) and E2 (mAb D4.12.9) were obtained with hepatocytes derived from the HCV-infected cirrhotic liver corresponding to VP3 of genotype 2b (results not shown). HCV core antigen was also clearly detected in the HCV-infected hepatocytes corresponding to VP2 of genotype 1b, as shown in Fig. 3D, panel b. However, the mAb to HCV core antigen from Biodesign (recombinant HCV core antigen of genotype 1b as immunogen) used here did not react with hepatocytes derived from the HCV-infected cirrhotic liver corresponding to VP3 of genotype 2b (results not shown). These results support that the E1E2 epitope recognized by the mAb D32.10 is expressed in the cytosol of HCV-infected hepatocytes in parallel with E2 and core antigens.

## Discussion

HCV preferentially infects and replicates in human or chimpanzee hepatocytes. A new model utilizing liver material obtained from HCV-infected patients [10] which more closely resembles the natural HCV infection provided a good opportunity for the analysis of the virus particles released from primary cultured human hepatocytes. Our objective was to investigate the expression of envelope proteins on the surface of liver-derived particles (HCV-lp) by using the unique mAb D32.10 which recognizes a highly conserved discontinuous determinant shared between E1 and E2 [12]. To this end, three different viral preparations: VP1, VP2 (genotype 1b) and VP3 (genotype 2b) from three different patients were analyzed for the E1E2/D32.10 antigenic reactivity in ELISA and Western blot. VP2 and VP3 exhibited a positivity in ELISA up to 6.5 µg of protein/ml, which corresponded to  $5 \times 10^3$  to  $5 \times 10^4$  copies of HCV RNA or viral genome equivalents (vge), which was around the limit of detection of the bDNA technique. This suggests that all HCV RNA-containing particles present in these preparations and released from infected hepatocytes express the D32.10 epitope on their surface. The detection in immunoblotting of both E1 and E2 monomeric forms under reducing conditions, and E1E2 oligomeric forms under non reducing conditions supports such an assertion. Moreover, a close correlation was observed between the detection of HCV RNA and the E1E2/D32.10 antigenic activity.

HCV-specific core proteins as monomeric (25 kDa) and oligomeric (multiple of 25 kDa) forms were clearly identified in HCV-lp present in the VP2 preparation. They are likely specific for the HCV capsid since no signal was observed with an HCV negative control (Fig. 1C). These last results are in accordance with those previously found in serum-derived HCV particles (HCVsp) by using other anti-core mAbs for the revelation [11]. This supports molecular heterogeneity of HCV core proteins detected in Western blotting for the capsid from natural HCV particles derived either from liver or serum of HCV-infected patients. The oligomeric forms of the HCV core protein could be detected even in the absence of monomers, as suggested by the results obtained from VP1 and VP3 preparations. The presence of key peptide sequences for initiating spontaneous multimerization in the C-terminal domain of the core protein (aa 125-179) has been shown [13]. Such oligomerization of the core protein to form capsid-like structures would be crucial for interaction with the cytoplasmic domain (aa 288-346) of the E1 envelope protein [14] during the assembly of HCV in normal human hepatocytes. Thus, the natural enveloped HCV particles could be more resistant to complete dissociation, even in

### ARTICLE 3

the presence of reducing agents. It is also interesting to note that the monomeric form of the core protein we identified in natural serum- or liver-derived HCV particles has a molecular weight of 25 kDa instead of 21 kDa as expected. Although it has long been suggested that the precursor 25 kDa core protein undergoes further processing into mature, functional unit of 21 kDa, our observations may support a model proposed by Vauloup-Fellous et al. [15] according to which the precursor form may be the HCV core protein committed to virus particle morphogenesis, thus increasing the stability of the viral capsid. Our data show - for the first time - that HCV RNA-containing particles released from primary cultured human hepatocytes derived from *in vivo*-infected cirrhotic livers express the unique E1E2 epitope recognized by the mAb D32.10 and correspond to complete virions as identified in the VP2 preparation.

To further characterize the liver-derived HCV particles, the different VPs of genotype 1 or 2 were subjected to sucrose equilibrium density gradient ultracentrifugation. This separation strategy revealed the presence of only one major HCV RNA-containing population which expressed the E1E2/D32.10 epitope detected both in ELISA and in Western blot under reducing or non reducing conditions. These liver-derived HCV RNA/E1E2(+) particles exhibited a density between 1.15 and 1.25 g/ml. This fits in with the previous reports showing that the buoyant density of HCV virions released from hepatocytes into supernatant ranged from 1.16 to 1.20 g/ml [16] corresponding to the density of other flaviviruses. More recently, by sucrose density gradient analysis of infectious cell culture grown HCV (HCVcc-JFH-1, genotype 2a) secreted by liver-derived cell lines (Huh7, HepG2 and IMY-N9), the HCV core protein and RNA were recovered at a density of 1.15 g/ml [6, 17, 18]. To dissipate the possibility that the signal observed could be due to the presence of cellular material which could have the same density, a parallel analysis of non-infected (HCV-) liver explants was performed, and no HCV-specific E1E2 or RNA signals could be detected throughout the gradient. Thus, we demonstrate that the liver-derived HCV particles (HCV-lp) exhibit similar physicochemical properties to recombinant HCV virions (HCVcc) as well as serum-derived HCV particles (HCVsp) [11] when analysed in a sucrose density gradient.

However, several papers have previously reported that HCV in patients' sera sedimented at a lower density ( $\leq 1.10$  g/ml) in association with very-low-density lipoprotein (VLDL) as a lipid particle (LVP for lipo-viro-particles) containing triglyceride, phospholipid, ApoB and ApoE [19, 20]. These LVP have been shown to be not predominantly synthesized in the liver but also originate in the intestine [21]. Recent results of Nielsen et al. [22] have indicated that the association between HCV and VLDL occurred in the liver. We noticed that in these studies [20, 22], HCV has been purified by

### ARTICLE 3

using isotonic iodixanol (Optiprep; Axis-Shield) gradients which are known to be superior to sucrose gradients in preserving the integrity of host lipoprotein-virus complexes. These differences in density distribution of HCV RNA in serum as well as in liver could be explained by the fractionation techniques used for the characterization of HCV particles. The iodixanol density gradients preserve the association of HCV with lipoproteins while the sucrose density gradients could unmask the E1E2 envelope complexes without affecting their immunogenicity. Thus, the population of the virus characterized here correspond to HCV RNA-containing particles expressing the E1E2-D32.10 epitope which could be associated with ApoB and ApoE, in the same manner as viral particles circulating in serum (N. Ndongo and M.-A. Petit, communication at “Réseau National Hépatites” of “Agence Nationale de Recherche sur le SIDA” [ANRS], 21-22 January 2010, Paris, France).

Moreover, we showed the expression of the E1E2/D32.10 epitope within HCV-infected human hepatocytes from cirrhotic livers in parallel with the one of E2 alone and core in immunostaining. Strong granular, cytoplasmic accumulation of HCV antigens was observed. These results are in accordance with those obtained previously in cirrhotic and tumoral liver sections [23]. They support that the mAb D32.10 as well as the mAb D4.12.9 recognize conserved epitopes and are powerful tools for detection of HCV envelope antigens independently of genotype in infected hepatocytes.

In conclusion, the conserved E1E2 original epitope defined by the mAb D32.10 is expressed within the HCV-infected hepatocytes and on the surface of liver-derived HCV particles as well as of circulating HCV particles [11]. These results reinforce the relevance of the mAb D32.10 for HCV studies and diagnostic approaches.

### **Acknowledgments**

This study was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) and by grants from ANRS (Agence nationale de recherché sur le sida et les hépatites virales) in France, and from Canadian Liver Foundation in Canada.

## ARTICLE 3

### References

- 1 Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM: *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*; in Knipe DM, Howley PM (eds): *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 2007.
- 2 Fournier C, Sureau C, Coste J, Ducos J, Pageaux G, Larrey D, Domergue J, Maurel P: Infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1998;79:2367-2374.
- 3 Rumin S, Berthillon P, Tanaka E, Kiyosawa, K., Traubad MA, Bizollon T, Gouillat C, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Inchauspé G, Trépo C: Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol* 1999;80: 3007-3018.
- 4 Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ: Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 1998;72:3827-3836.
- 5 Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL: Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197:633-642.
- 6 Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-796.
- 7 Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005;309: 623-626.
- 8 Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV: Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:9294-9299.
- 9 Foy E, Li K, Sumpter R Jr, Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr: Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2986-2991.
- 10 Raymond VA, Selliah S, Ethier C, Houle R, Jouan L, Maniere T, Lamarre D, Willems B, Bilodeau M: Primary cultures of human hepatocytes isolated from hepatitis C virus infected cirrhotic livers as a model to study hepatitis C infection. *Liver Int* 2009;29: 942-949.
- 11 Petit MA, Lièvre M, Peyrol S, De Sequeira S, Berthillon P, Ruigrok RW, Trépo C: Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. *Virology* 2005;336:144-153.

### ARTICLE 3

- 12 Petit MA, Jolivet-Reynaud C, Peronnet E, Michal Y, Trépo C: Mapping of a conformational epitope shared between E1 and E2 on the serum-derived human hepatitis C virus envelope. *J Biol Chem* 2003;278:44385-44392.
- 13 Kim M, Ha Y, Park HJ: Structural requirements for assembly and homotypic interactions of the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 2006;122:137-143.
- 14 Nakari K, Okamoto T, Kimura-Someya T, Ishii K, Lim CK, Tani H, Matsuo E, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Miyamura T, Nunberg JH, Moriishi K, Matsuura Y: Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J Virol* 2006;80:11265-11273
- 15 Vauloup-Fellous C, Pène V, Garaud-Aunis J, Harper F, Bardin S, Suire Y, Pichard E, Schmitt A, Sogni P, Pierron G, Briand P, Rosenberg AR: Signal peptide peptidase-catalyzed cleavage of hepatitis C virus core protein is dispensable for virus budding but destabilizes the viral capsid. *J Biol Chem* 2006;281:27679-27692.
- 16 Ito T, Mukaigawa J, Zuo J, Hirabayashi Y, Mitamura K, Yasui K: 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* 1996;77:1043-1054.
- 17 Parent R, Qu X, Petit MA, Beretta L: The heat shock cognate protein 70 is associated with hepatitis C virus particles and modulates virus infectivity. *Hepatology* 2009;49:1798-1809.
- 18 Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T: Characterization of infectious hepatitis C virus from liver derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377:747-751.
- 19 Galy O, Petit MA, Benjelloun S, Chevallier P, Chevallier M, Srivatanakul P, Karalak A, Carreira C, Lyandrat N, Essaid A, Trepo C, Hainaut P, Chemin I: Efficient hepatitis C antigen immunohistological staining in sections of normal, cirrhotic and tumoral liver using a new monoclonal antibody directed against serum-derived HCV E2 glycoproteins. *Cancer Lett* 2007;248:81-88.

## ARTICLE 3

**Table 1.** Protein concentration and HCV RNA content of liver-derived viral preparations (VP1, VP2 and VP3)

HCV1p preparations (genotype)	Protein concentration <sup>a</sup> mg/ml	HCV RNA <sup>b</sup> copies/ml	HCV RNA/ protein copies/mg of protein
VP1 (1b)	9.3	7 x 10 <sup>6</sup>	0.75 x 10 <sup>6</sup>
VP2 (1b)	2	2 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>
VP3 (2b)	5	3.7 x 10 <sup>7</sup>	7.4 x 10 <sup>6</sup>

<sup>a</sup>Protein concentration was determined by BCA protein assay (Sigma Aldrich, Germany).

<sup>b</sup>HCV RNA was quantified using branched-DNA VERSANT HCV RNA 3.0 Assay (Bayer Diagnostics, Berkeley, Calif).

## Figure legends

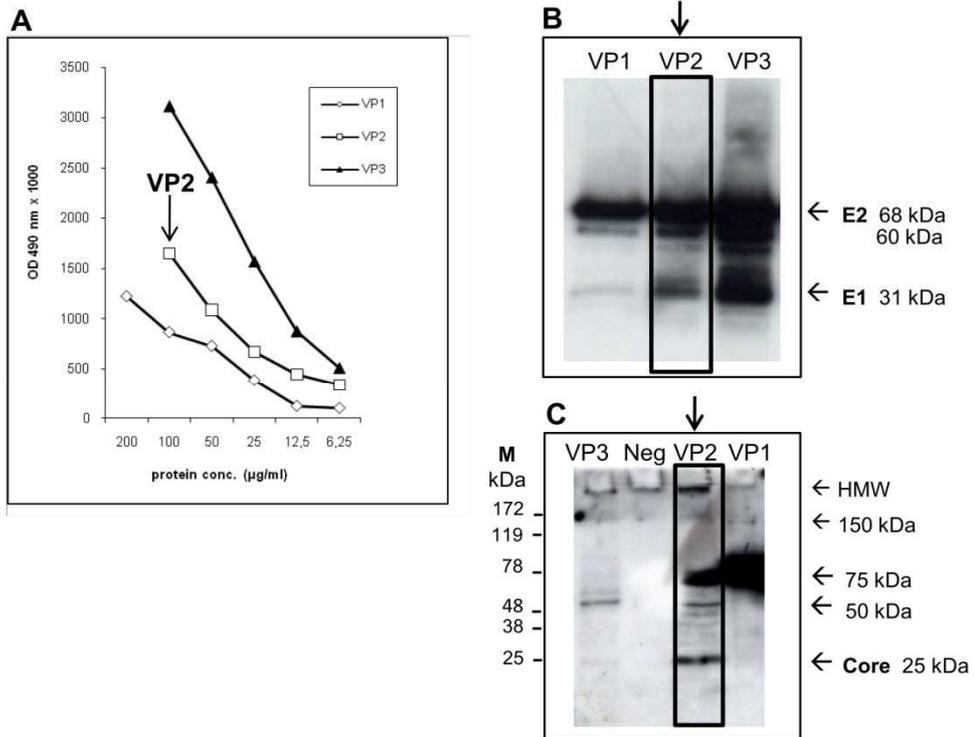
**Fig 1.** Immunological characteristics of VP1, VP2 and VP3. **A** E1E2 antigenic titration of HCV-enriched pellets or viral preparations (VPs) by ELISA. VP1, VP2 or VP3 were coated on solid surface at concentrations between 6.25 to 200  $\mu\text{g}$  of protein/ml. The mAb D32.10 was used as primary antibody at a concentration of 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in TN (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 100 mM NaCl) buffer diluted in 50% of NHS. The optical density was read using a Multiskan Spectrometer (Thermo Electron Corporation) at 490 nm. **B** Detection of E1 and E2 glycoproteins in VPs by Western blot. Six  $\mu\text{g}$  of protein of each VP were loaded on 10% gels in reducing conditions (2% SDS + 5% 2  $\beta$ -mercaptoethanol). E1 and E2 proteins were detected by using the anti-E1E2/D32.10 mAb (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and then blots were revealed with the ECL plus system (Amersham Biosciences) following the manufacturer's instructions. **C** Detection of core proteins in VPs by Western blot. Fifty  $\mu\text{g}$  of protein of each VP were loaded. Detection of HCV core proteins was performed by using rabbit polyclonal anti-core antibodies (C3, USBiological). Molecular mass markers (M) were indicated on the left and molecular weights of HCV-specific proteins were expressed in kDa and indicated on the right. HMW, high molecular weight. Neg, pellet from culture supernatants of non-infected liver transplants, i.e. negative control HCV(-).

**Fig 2.** Density distribution of liver-derived HCV particles. Panels **a**, Isopycnic centrifugation in sucrose density gradient (10-60%) of VP1 (**A**), VP2 (**B**) and VP3 (**C**). The density of fractions was determined by refractometry and expressed in g/ml (right axis). All fractions were tested at the dilution of 1/5 for E1E2 antigenic activity by indirect ELISA using the mAb D32.10. The results were expressed as positive to negative (P/N) ratio (left axis). The cut-off was visualized by dotted line and corresponds to P/N=2.1. HCV RNA was analyzed in each fraction by b-DNA (Bayer Diagnostics, Berkeley, Calif) and represented as dark bars. Panels **b**, Western blot analysis of VP1 (**A**), VP2 (**B**) and VP3 (**C**). HCV pellet (5  $\mu\text{g}$ ) and selected fractions (10  $\mu\text{g}$  per lane) from the sucrose gradient (cf. panels a) were subjected to 10% SDS-PAGE under non reducing (NR) or reducing (R) conditions. The HCV E1 and E2 proteins were detected using the mAb D32.10 and blots were developed with an enhanced chemiluminescence detection system (ECL plus system, Amersham Biosciences). Molecular weights of HCV-specific proteins were expressed in kDa and indicated on the right of the gels. Negative control (HCV-) (**D**) was obtained from non-infected liver and analysed in a sucrose density gradient as in Fig. 2A, B and C. HCV RNA was tested in each fraction by quantitative real time RT-PCR (detection limit = 10 copies/ml) and found negative all along the gradient (< 10 copies/ml, not shown).

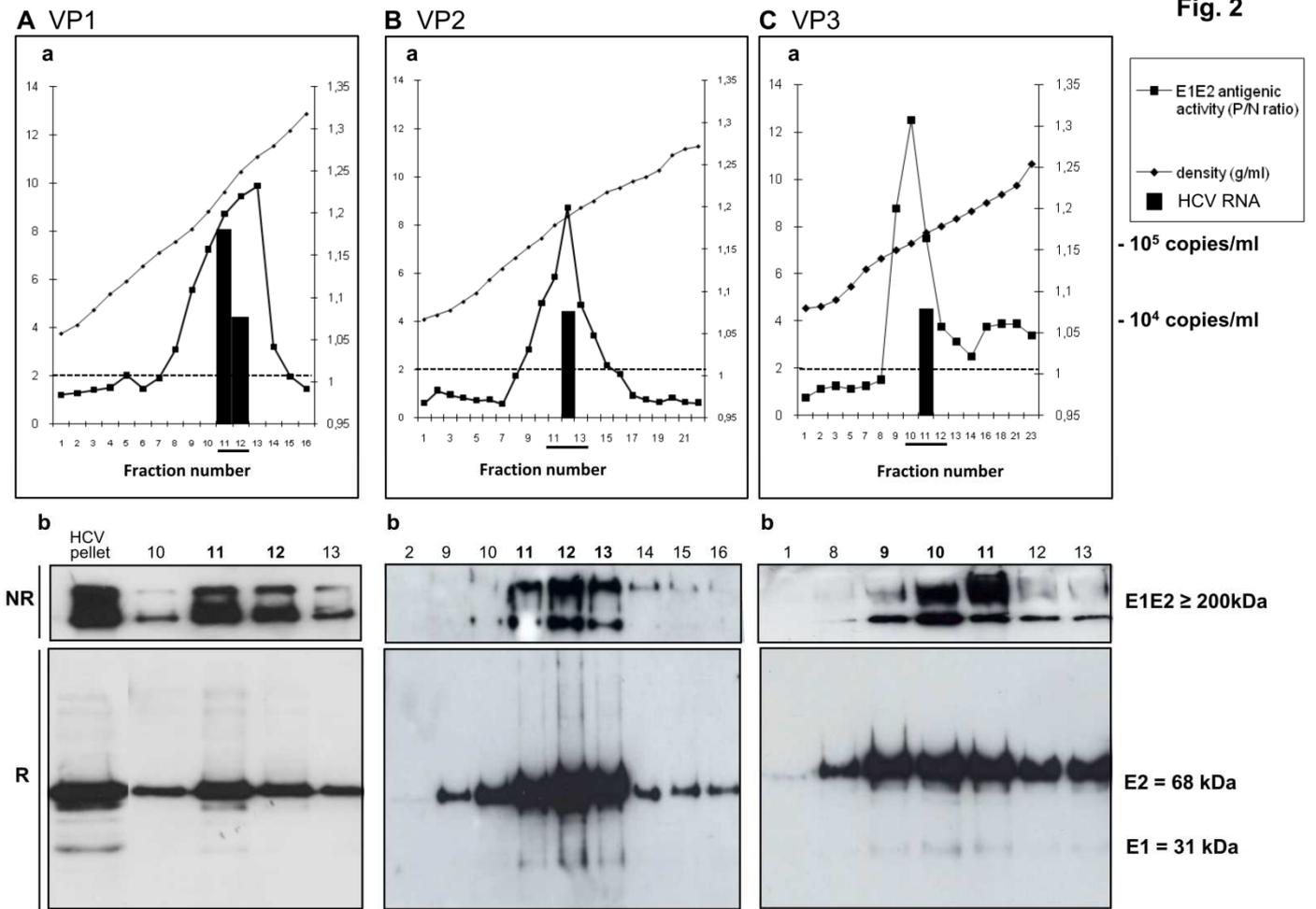
### ARTICLE 3

**Fig 3.** E1E2, E2 and core antigen detection in HCV-infected hepatocytes by IHC. IHC was performed in primary cultured hepatocytes derived from non-infected normal liver HCV(-) (Panels **a**) and from liver chirurgical biopsy of cirrhotic patient HCV(+) corresponding to VP2 of genotype 1b (Panels **b**). **A** Control irrelevant IgG1 primary antibodies (5 µg/ml). **B** Anti-E1E2/D32.10 mAb (2.5 µg/ml). **C** Anti-E2/D4.12.9 mAb (1 µg/ml). **D** Anti-core mAb (clone 11-B3, Biodesign International) (20 µg/ml). The Dakocytomation Envision dual link system HRP kit (Dako, Denmark) was used for the revelation according to the manufacturer's instructions. The brown-colored precipitate was observed by light microscopy (magnification x40).

Fig. 1



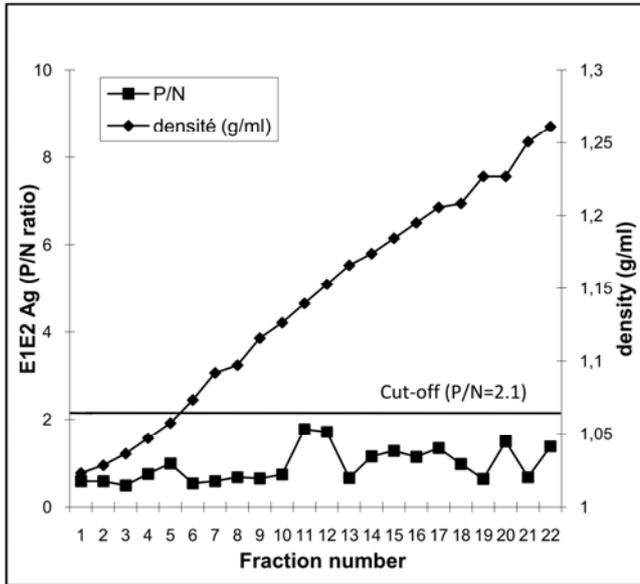
NDONGO *et al.*



NDONGO *et al.*

Fig. 2

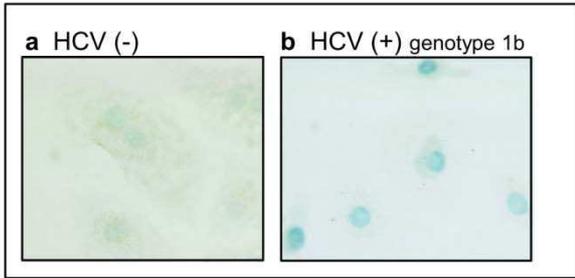
D HCV(-)



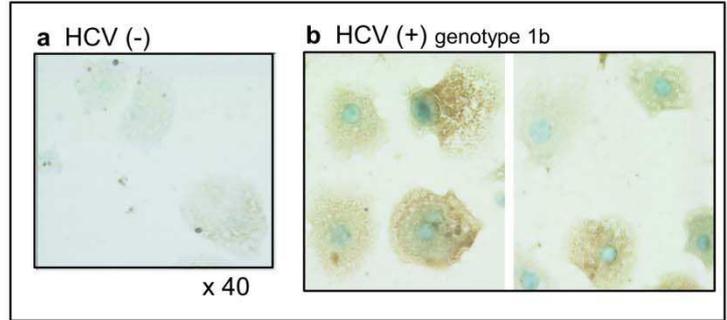
NDONGO *et al.*

**Fig. 3**

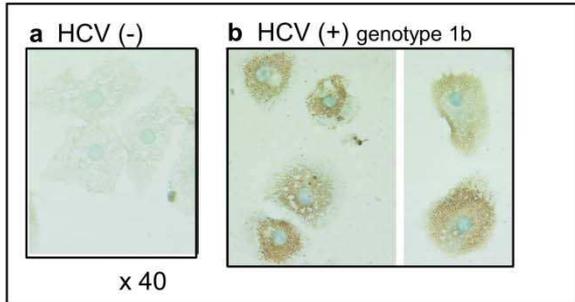
**A Control**



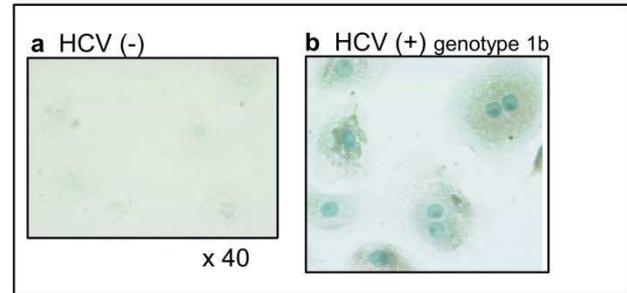
**C Anti-E2/D4.12.9**



**B Anti-E1E2/D32.10**



**D Anti-Core**



NDONGO *et al.*

**4. ARTICLE 4 - ASSOCIATION DES ANTICORPS ANTI-E1E2 A LA  
GUERISON SPONTANEE OU A LA REPOSE VIROLOGIQUE SOUTENUE  
AUX TRAITEMENTS ANTIVIRAUX AU COURS DE L'INFECTION  
PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE C**

**Association of anti-E1E2 antibodies with spontaneous recovery or sustained  
virological response to therapy in patients with HCV**

Ndiémé Ndongo, Pascale Berthillon, Pierre Pradat, Claude Vieux,  
Isabelle Bordes, Françoise Berby, Marianne Maynard,  
Fabien Zoulim, Christian Trépo and Marie-Anne Petit

*Hepatology*(en révision)



## ARTICLE 4

L'anticorps anti-E1E2/D32.10 reconnaît un épitope combinatoire impliquant une région de la protéine E1, et deux régions de la protéine E2, exprimé à la surface des particules HCV sériques [Petit et al., 2005]. Cet anticorps présente des propriétés pertinentes puisque nous avons montré par différentes approches *in vitro*, qu'il était capable d'inhiber efficacement les interactions entre les HCVsp et les cellules hépatocytaires (Huh-7 et HepaRG) et pouvait avoir un effet neutralisant sur l'infection des HepaRG par les virions sériques. De plus, il a été montré que des anticorps de même spécificité que le D32.10 étaient présents dans le sérum de patients infectés par le HCV. Par une approche ELISA spécifique, nous avons recherché la prévalence des anticorps anti-E1E2 chez différents groupes de patients infectés par le HCV afin de déterminer leur signification clinique. Le test de détection de ces anticorps a été décrit [Petit et al., 2005] puis mis au point au sein de notre équipe. Son principe repose sur l'utilisation de trois peptides biotinylés (E1, E2A et E2B), correspondant aux trois régions reconnues par l'anticorps D32.10, qui sont adsorbés séparément sur une surface solide via la streptavidine (**Figure 44**). Le seuil de positivité est calculé en ajoutant 3 déviations standards à la moyenne des contrôles négatifs (sérums humains normaux provenant de donneurs de sang HCV, HBV et HIV négatifs) (Figure 1). Ainsi, un échantillon est considéré positif pour les anticorps anti-E1E2A,B quand il est positif pour chacun des peptides E1, E2A et E2B. Ce test a été validé aussi bien sur le plan de la sensibilité que sur le plan de la spécificité avec des variations intra et inter-essais  $\leq 5\%$ .

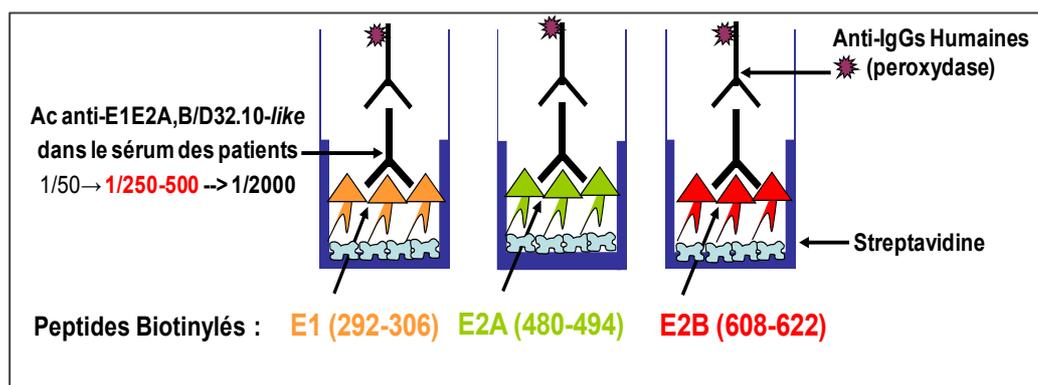


Figure 44 : Test ELISA de détection des anticorps anti-E1E2A,B [Petit et al., 2005].

Les 3 peptides biotinylés (E1, E2A, E2B) sont adsorbés sur une surface solide via la streptavidine. Les anticorps anti-E1E2A,B sont recherchés à partir de sérums de patients infectés par le HCV. L'étape de révélation se fait en ajoutant les anticorps anti-IgG humains couplés à la peroxydase.

#### ARTICLE 4

Au cours de cette étude, nous avons d'abord recherché la séroprévalence des anticorps anti-E1E2A,B chez des patients qui ont guéris spontanément de leur infection HCV (virémie négative et transaminases normales) comparés à des patients virémiques porteurs chroniques du HCV et ayant reçu aucun traitement antiviral. Sur 52 patients guéris, 46 sont positifs pour les anti-E1E2A,B ce qui représente un pourcentage de 88,5% avec des titres en anticorps très élevés  $\geq 1/1000$  dans 80% des cas (**Figure 2**). A l'inverse, seulement 7 patients porteurs chroniques sur 50 (14%) ont été retrouvés positifs pour ces anticorps. Des résultats similaires ont été obtenus avec les immunoglobulines purifiées à partir du sérum de ces différents groupes de patients (**Figure 3**). Cela confirme la spécificité de cette anticorps et suggère que les anticorps anti-E1E2A,B (ou *D32.10-like*) pourraient être des anticorps de guérison et sont associés au contrôle de l'infection HCV.

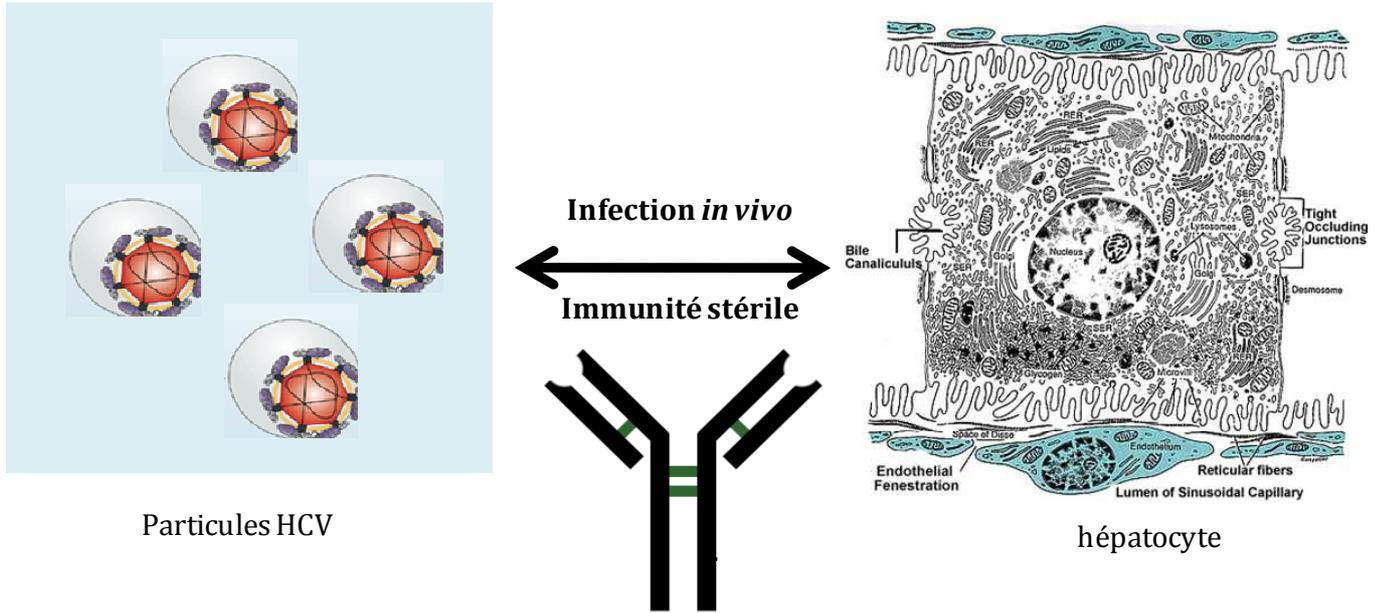
Dans un deuxième temps, nous avons comparé 52 patients répondeurs complets (RC) et 40 non répondeurs (NR) à des traitements antiviraux successifs avec de l'IFN standard ou pégylé associé à la ribavirine. Les résultats ont montré que seuls 10% des NR étaient positifs pour les anticorps anti-E1E2A,B contre 40,4% pour les RC (**Figure 4**). Le titre des anticorps chez ces patients RC qui ont complètement éliminé le virus après une thérapie antiviral est variable et relativement faible  $\leq 1/500$  dans 50% des cas. Ce taux partiel de réponse anti-E1E2A,B chez les patients RC pourrait s'expliquer par une variabilité du temps de récupération des échantillons après arrêt du traitement. En effet, les 21 échantillons trouvés positifs sur les 52 testés correspondent à des prélèvements obtenus relativement précocement après l'arrêt du traitement (6 mois à 1an) tandis que les échantillons négatifs (31/52) correspondent à des prélèvements obtenus entre 1et 5 ans après l'arrêt du traitement. Ceci suggère que la réponse humorale anti-E1E2A,B chez les répondeurs complets pourrait décroître en fonction du temps après l'arrêt du traitement.

Pour déterminer la cinétique d'apparition des anticorps anti-E1E2A,B, nous avons réalisé une étude longitudinale de ces anticorps chez 9 patients RC et 7 patients NR à différents temps avant, pendant et après traitement : 1 mois (M-1) avant le début du traitement (TRT), au temps 0 (M0) du TRT, 1 mois (M+1), 2 mois (M+2), 3 mois (M+3), 6 mois (M+6) et 12 mois (M+12) après le début du TRT, et 6 mois (+6M) après l'arrêt du TRT (Figure 5). Nos résultats montrent une absence des anticorps anti-E1E2A,B chez les

#### ARTICLE 4

NR tout au long du suivi. Cependant, cette réponse humorale a été trouvée significativement ( $p < 0,05$ ) positive pour tous les échantillons du groupe des RC par rapport au groupe des NR, notamment à 1 mois avant (M-1) et 3 mois (M+3) après le début de la TRT (M +3) avec une probabilité,  $p < 0,001$ . Cette réponse anticorps présente un profil fluctuant « en dent de scie » avec un pic à 1 mois (M1) après le début du traitement, puis une diminution à M+2 et un maintien ou une remontée à M+3 ou M+6. Bien que toujours positifs à M+12 après le début du traitement et à 6 mois après l'arrêt du traitement, le taux d'anticorps anti-E1E2A,B semble diminuer dans le temps, ce qui pourrait expliquer les résultats de l'étude transversale avec seulement 40% de sérums positifs chez les patients RC. L'analyse de ces résultats par le tracé des courbes ROC (receiver operating characteristic) a permis de déterminer la sensibilité des anticorps anti-E1E2A,B pour la prédiction de la réponse au traitement à différents temps : M-1, M+3, M+6. Des valeurs seuils ont ainsi pu être calculées et les patients avec des valeurs supérieures à ce seuil sont considérés comme répondeurs aux traitements alors que ceux avec des valeurs inférieures au seuil ne sont pas des répondeurs virologiques soutenus. La spécificité et la valeur prédictive positive (VPP) du test sont aussi de 100% alors que la sensibilité et la valeur prédictive négative (VPN) sont de 87,5% à M-1, M+1 et M+3 (Table 2). Les résultats obtenus au cours de ces études longitudinales montrent que les anticorps anti-E1E2A, B sont présents précocement, avant même le début du traitement chez les patients répondeurs complets et peuvent donc être prédictifs d'une réponse virologique soutenue à une thérapie antivirale.

En conclusion, les résultats obtenus au cours de cette étude *in vivo* suggèrent que les anticorps anti-E1E2A,B pourraient être des anticorps de guérison associés à une éradication complète spontanée du HCV chez les patients infectés et sont prédictifs d'une réponse virologique complète chez les patients porteurs chroniques soumis à une thérapie antivirale standard (IFN pégylé + ribavirine) (**Figure 45**). Ces anticorps anti-E1E2A,B représentent un nouveau marqueur du HCV dont la recherche dans le sérum parallèlement à l'ARN viral pourrait constituer un outil décisionnel précieux pour la prise en charge des patients infectés par le HCV.



**Réponse humorale anti-E1E2A,B/D32.10-like** durant l'infection HCV naturelle *in vivo*  
= Prédicative de la réponse virologique soutenue à une thérapie antivirale  
(VPP & VPN ≈ 100% & 86% à M-1)  
➔ **VALORISATION DE L'AcMo D32.10 = Applications diagnostiques et thérapeutiques**

*Figure 45 : Pouvoir neutralisant in vivo de l'anticorps anti-E1E2/D32.10*

**Association of Anti-E1E2 antibodies with spontaneous recovery or sustained viral response to therapy in patients infected with HCV**

Ndiémé Ndongo<sup>1,2</sup>, Pascale Berthillon<sup>1,2</sup>, Pierre Pradat<sup>3</sup>, Claude Vieux<sup>3</sup>,  
Isabelle Bordes<sup>1,2</sup>, Françoise Berby<sup>1,2</sup>, Marianne Maynard<sup>3</sup>, Fabien Zoulim<sup>1,2,3</sup>,  
Christian Trépo<sup>1,2,3</sup> and Marie-Anne Petit<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U871, 151 Cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, France. <sup>2</sup>Université Lyon 1, IFR62 Lyon-Est, 69008 Lyon, France. <sup>3</sup>Hospices Civils de Lyon, Hôtel Dieu, Service d'Hépatologie et de Gastroentérologie, 69002 Lyon, France

**Keywords :** HCV infections, envelope proteins, humoral response, predictive value, HCV diagnosis

\* **Corresponding author :** Marie-Anne Petit, Ph.D. INSERM U871, 151 Cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, France.

## (ABSTRACT)

The monoclonal antibody (mAb) D32.10 recognizes a discontinuous epitope encompassing three regions E1(aa297-306), E2A(aa480-494) and E2B(aa613-621) juxtaposed on the surface of serum-derived HCV particles (HCVsp). The mAb D32.10 inhibits efficiently and specifically the binding of HCVsp to human hepatocytes. Therefore, we investigated the clinical relevance of anti-E1E2A,B response in the serum of patients infected with Hepatitis C Virus (HCV). To this end, an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) using synthetic E1, E2A and E2B derived peptides was used. The ELISA was validated in terms of sensitivity, specificity, and test efficiency. The detection of the anti-E1E2 D32.10 epitope-binding antibodies during natural HCV infection in more than 300 HCV-positive sera demonstrated significantly ( $p < 0.001$ ) higher prevalence of these antibodies: (i) in patients who spontaneously cured HCV infection (46/52, i.e. 88.5%) showing high titers (70%  $\geq$  1/1000) compared to never treated chronic hepatitis C patients (7/50, 14%) who actively replicated the virus, and (ii) in complete responders (21/52, i.e. 40.4%) who cleared virus following treatment and achieved a sustained viral response (SVR) compared to non-responders (4/40, 10%). Serum anti-E1E2 antibodies were monitored before, during and after the current standard of care therapy (pegylated interferon plus ribavirin) in responder and non-responder patients. Optimal cut-off values were assessed by Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis. One month prior therapy initiation, the threshold of 1131 (O.D. x1000) gave a 100% and 86% positive and negative predictive values, respectively, for achieving or not a SVR. *Conclusion:* The anti-E1E2 D32.10 epitope-binding antibodies are associated with control of HCV infection and may represent a new relevant prognostic marker in serum. This unique D32.10 mAb may also have immunotherapeutic potential.

## ARTICLE 4

### (INTRODUCTION)

Hepatitis C Virus (HCV) is the major etiological agent of liver disease in the world with approximately 180 million virus carriers. The majority (80%) of infected individuals progresses to chronic hepatitis that increases their risk for developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. Spontaneous clearance, however, during the acute phase may occur in a minority of subjects (20%) without medical treatment [2]. Therefore identification of protective determinants is essential for understanding the role of neutralizing responses in disease pathogenesis, and for developing vaccines and antibody-based therapies. New tools were developed over the last years to study virus-host interactions. They include HCV-like particles (HCV-LP), HCV pseudotyped particle (HCVpp), and infectious cell culture HCV particles (HCVcc) produced by transfection of Huh-7 cells and derivatives with a particular genotype 2a clone called JFH-1 [3]. These systems were used to evaluate the neutralizing activity of mAbs and antibodies from patients [4]. There was thus increasing evidence for a role of neutralizing antibodies in controlling HCV during all stages of infection [5, 6], but the presence of these antibodies were not associated with viral clearance *in vivo* [7] or with response to antiviral therapy [8]. The human neutralizing antibodies identified targeted the hypervariable region 1 (HVR1) at the E2 N-terminal part. Due to the extreme variability of the virus, escape variants emerged and poor cross-neutralization was observed [5,6]. Furthermore, high-density lipoproteins (HDL) were shown to attenuate the neutralization of HCVpp by HCV-infected patients antibodies [7, 9]. By contrast, the mouse mAb AP33, recognizing a highly conserved linear epitope in E2 spanning residus 413 to 420, demonstrated potent neutralization of infectivity against both HCVpp and HCVcc [10]. However, the prevalence of human serum AP33-like antibodies was low (< 2.5%), suggesting that these antibodies do not play a major role in natural clearance of HCV infection [11].

## ARTICLE 4

Previously, we have shown that the mouse mAb D32.10 recognized a unique discontinuous epitope formed by one sequence between amino acids (aa) 297-306 in the E1 protein, and two sequences between aa 480-494 and 613-621 in the E2 protein [12], all expressed close together on the surface of serum-derived enveloped HCV particles (HCVsp) [13]. Furthermore, the mAb D32.10 is so far only one which can efficiently inhibit the interactions between HCVsp and hepatocytes [14].

In order to validate the relevance of the mAb D32.10 in vivo we used the D32.10 epitope as a probe to look for the presence of anti-E1E2A,B D32.10 epitope-binding antibodies in the serum of HCV-infected patients able to clear infection. The prevalence of anti-E1E2 antibodies in serum was high in patients who either resolved the infection spontaneously, or who achieved a sustained viral response after antiviral therapy. Thus, the E1E2A,B D32.10 epitope-binding antibody response appears as associated with control of HCV infection in vivo and may be predictive of the response to HCV treatment.

### **Patients and Methods**

***Patient Samples.*** Human HCV antibody-positive serum samples were obtained from 194 individuals, tested by third-generation ELISA (Ortho Diagnostics), and classified according to 4 groups. Group 1: Fifty-two HCV RNA-negative samples were from 22 patients who had resolved spontaneously symptomatic or asymptomatic acute HCV infection in the past ( $\geq 10$  years), and from 30 patients whose date of acute infection was unknown. Only 50% (26/52) of samples were analyzed for genotyping and 25 out of 26 were of genotype 1 (Table 1). Group 2: Fifty serum samples were from never treated (NT) chronic carriers. Fifty-eight percent (28/48) were of genotype 1 and 42% (20/48) of genotype non-1 (Table 1). Their median HCV viral load was 5.8 log<sub>10</sub> IU/ml (range: 3.4-7.8 log<sub>10</sub> IU/ml) for 44 out of 47 cases (Table 1). Fifty-four percent (26/48) showed elevated transaminases (median = 1.4 x ULN,

## ARTICLE 4

range 1.06-4.90 x ULN) whereas 46% (22/48) had normal levels (median = 0.75 x ULN, range 0.3-1 x ULN). Seventy-seven percent (27/35) exhibited no or low activity (A0-A1) and 63% (27/43) had a Metavir fibrosis score of F0-F1 (Table 1), reflecting minimal liver lesions. Group 3: Forty serum samples were from chronically infected patients who did not respond to multiple successive antiviral therapies with standard or pegylated (PEG) interferon (IFN) in association with ribavirin in the majority of cases (77%, 30/39) (Table 1). HCV RNA levels showed a median of 5.7 log<sub>10</sub> IU/ml (range: 4.7-6.9 log<sub>10</sub> IU/ml) for 27 out of 35 cases (Table 1). Seventy-six percent (28/37) were of genotype 1, and had elevated transaminase levels (median = 2 x ULN, range 1-9 x ULN). The majority (88%, 28/32) had minimal or moderate activity (A1-A2), but 75% (24/32) showed fibrosis stage  $\geq$  F2 of whom 5 had cirrhosis (Table 1). Group 4: Fifty-two samples were obtained 6 months to 5 years after stopping antiviral treatment from patients who achieved a sustained viral response (SVR) and were thus considered as complete responders (CR, Table 1). Fifty-three percent (24/45) were of genotype 1 and 47% (21/45) of genotype non-1. Their serum HCV RNA was negative and their transaminase levels normal (Table 1). These CR patients exhibited similar degrees of liver disease (Metavir score) than the NR patients (Table 1). The control group was composed of 17 normal human serum (NHS) samples from blood donors (negative for HCV, HBV and HIV).

When mentioned, sera were inactivated by heating to 56°C for 30 min before use. All serum samples had been stored at -80°C upon collection (INSERM Unit 871 and/or Hepato-Gastroenterology Unit of Hotel Dieu Hospital, Lyon, France).

***Determination of viral load and genotyping.*** HCV viral loads were quantified at the virology laboratory of the Hotel-Dieu Hospital on the patient samples using either the Versant™ HCV RNA 3.0 bDNA assay from Bayer HealthCare (Tarrytown, NY) or the Quantiplex™ HCV RNA bDNA assay from Chiron Corporation (Emeryville, CA, USA), as

#### ARTICLE 4

specified by the manufacturer. All the results were converted and expressed in International Units (IU) per ml of serum (1MEq = 159,000 IU/ml). HCV genotype was determined locally by the Line Probe Assay INNO-LiPA HCV II (Innogenetics, Gent, Belgium).

***Anti-E1E2A,B D32.10 epitope-binding antibody detection.*** Three biotinylated peptides were synthesized : Peptide E1 (Bio-TFSPRRHWTTQGCNC-amide) covers amino acid residues 292 to 306 of the HCV E1 glycoprotein, peptide E2A (Bio-PDQRPYCWHYPPKPC-amide) amino acid residues 480 to 494 and peptide E2B (Bio-LVDYPYRLWHYPCTI-amide) residues 608 to 622 of the HCV E2 glycoprotein [12]. Peptides were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, 2.5 % final), diluted with phosphate buffer saline (PBS) to 1 mg/ml, and stored at -20°C. Streptavidin (Promega) was coated onto 96-well Maxisorp microtiter plates (Immulon, Dynex) by incubating 100 µl (stock solution: 1 mg/ml diluted 1/100 in 0.1 M carbonate buffer pH 9.6, i.e.10 µg/ml in final) in each well (1 µg per well) overnight at 4°C. The wells were blocked with 200 µl of PBS1X (Cambrex) containing 10% goat serum (Eurobio, CAECHV00) for 1h at 37°C. Plates were washed three times with PBS, and 100 µl of the biotinylated peptide solution (10 µg/ml) was added. For each sample, triplicate wells were coated with either peptide E1, E2A or E2B for 2h at 37°C. After another wash with PBS, 100 µl of human serum diluted 1/250 or 1/500 in PBSTG (PBS containing 0.05 % Tween 20 and 10% goat serum) was added to the wells and incubated for 2h at 37°C. The plates were washed four times with PBST, and conjugate was added. Goat anti-human immunoglobulin G (IgG) peroxidase (Beckman Coulter France) was diluted 1/5,000 in PBSTG, added to the wells, and incubated at 37°C. After 1h, the wells were washed four times with PBST, and the substrate (o-phenylenediamine dihydrochloride [OPD] and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was added. The reaction was stopped after 30 min by adding 50 µl of 2N HCl. Color development was measured in an ELISA plate reader at 490 nm. Mean optical densities (O.D.) from triplicate wells containing

## ARTICLE 4

either peptide E1, E2A or E2B, and the mean O.D. of the control wells (NHS) were calculated. Serum samples from each patient were all processed on the same day, and each plate contained a positive control serum sample. The recognition cut-off for each peptide was calculated as the mean of the values obtained with at least 3 NHS + 3 standard deviations (S.D.).

***Sensitivity and specificity validation of anti-E1E2A,B test.*** To this end, the anti-E1E2A,B ELISA test was carried out either in the absence of peptide (no peptide) or with the three biotinylated peptides E1, E2A and E2B added together at the final concentration of 5 µg/ml each on the same well. The test was also performed by direct coating of non-biotinylated peptides on the solid phase. For testing the specificity of detection two irrelevant biotinylated peptides, peptide-1X (Bio-RSFKSWTGQTPGEFRESRRRDNPLG-amide; 25aa) and peptide-2X (Bio-SCARRGCIRRRPGHAG-amide; 16 aa) were used in comparison with E1, E2A and E2B peptides. The peptides 1X and 2X showed from 7% to 20% of sequence homology with the D32.10 epitope sequences E1, E2A and E2B. Peptide-1X did not contain any cysteine residue while peptide-2X contained 2 cysteine residues. Indeed, the critical residues for the D32.10 mAb recognition were identified as Cys<sup>306</sup> (E1), Cys<sup>494</sup> (E2A) and Cys<sup>620</sup> (E2B), respectively [12].

***Serum immunoglobulins purification.*** Serum immunoglobulins G (IgG) fraction was purified using protein G-Sepharose 4-fast flow (Pharmacia France, Montigny-le-Bretonneux). Two hundred µl of heat-inactivated serum diluted ½ in PBS was mixed with 200 µl of protein G-Sepharose immunobeads for 30 min at 25°C and then centrifuged for 90 sec at 3800 g. The supernatant was discarded and the immunobeads were then washed 3 times with Immunopure IgG binding buffer (Pierce Protein, Perbio Science France SAS) by centrifugation for 90 sec at 5000 g each time. Four hundred µl Immunopure IgG Elution buffer (Pierce Protein, Perbio Science France SAS) were added to the immunobeads, which were mixed thoroughly and

## ARTICLE 4

then centrifuged for 90 sec at 5000 g. The supernatant was neutralized with 35  $\mu$ l Tris-HCl 1M pH 8.0. The IgG concentration was determined using a micro BCA assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Purified IgGs were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The protein mean concentration for 4 serums from NHS was  $1.29 \pm 0.13$  mg/ml, for 12 serums from patients C and NR,  $2.09 \pm 0.46$  and  $3.65 \pm 0.56$  mg/ml respectively, and for 14 serums from patients NT,  $3.19 \pm 0.27$  mg/ml.

**Statistical analysis.** Statistical comparison between two groups of patients was performed with a *t* test and P values were calculated using the GraphPad Prism 4 software. P value  $<0.001$  represented as \*\*\* symbol corresponds to “extremely significant” results,  $0.001 < P < 0.01$  as \*\* very significant,  $0.01 < P < 0.05$  as \* significant, and  $P > 0.05$  not significant (ns). The overall sensitivity of anti-E1E2 antibodies for the prediction of treatment response was calculated using Receiver Operating Characteristic (ROC) curves at different time points before and during treatment in follow-up studies. Optimal cut-off values were defined using the highest sum of sensitivity and specificity. For each optimal cut-off value, sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated.

## Results

**Determination of the cut-off value and evaluation of precision of anti-E1E2A,B D32.10 epitope-binding antibodies detection test.** Negative controls (NHS, 5) were initially tested at different dilutions: 1/50, 1/100, 1/250, 1/500 and 1/1000 (Fig. 1A). Standard dilutions selected were 1/250 and 1/500. The cut-off values for both dilutions were determined with 17 NHS (negative for HCV, HBV and HIV, Fig. 1B). The mean O.D. values for E1, E2A and E2B were  $0.609 \pm 0.033$  for 1/250 dilution and  $0.374 \pm 0.036$  for 1/500 dilution. The cut-off

## ARTICLE 4

was calculated as the mean value + 3 S.D., and corresponded to 0.708 for 1/250 dilution, and 0.482 for 1/500 dilution. Each serum sample was tested in triplicate for the E1, E2A and E2B peptides. For an easier representation of results, they were expressed as the average of O.D. obtained for E1, E2A and E2B which are very similar as illustrated in the Fig. 1B. The interpretation for the presence or absence of anti-E1E2A,B antibodies took place according to these mean O.D. values. If the mean value was greater than or equal to the cut-off for a fixed dilution, the sample was defined as positive or limit for this dilution. If it was under the cut-off, the sample was considered negative. All the sera positive for anti-E1E2A,B contain antibodies that bind to the D32.10 epitope, i.e. to the 3 peptides, E1, E2A and E2B, and inversely the negative sera don't contain any of them. Therefore, these antibodies were called "D32.10 epitope-binding antibodies" throughout the text. At least 5 NHS samples were systematically included in each assay, and the cut-off re-calculated for each type of experiments.

The intra-assay variability was evaluated by testing a same positive sample 10 times in an intra-assay run, and showed a coefficient of variation (CV) < 4%. The inter-assay variability was evaluated by testing a same positive sample in triplicate in 7 independent runs at different days by the same technician, and showed a CV < 5%.

***Seroprevalence of anti-E1E2A,B D32.10 epitope-binding antibodies in natural human HCV infection.*** Figure 2A shows the results obtained with samples from 52 patients cured of HCV infection (Group 1: C). Twenty-two patients who had cleared spontaneously a past infection ( $\geq 10$  yrs) corresponded to the series 1 whereas the 30 other patients whose date of acute infection was unknown corresponded to the series 2. Among the total of 52 C patients, 46 were found positive for anti-E1E2A,B antibodies (88.5%) with a higher prevalence (21/22, i.e. 95.5%) in the series 1. Globally, relatively high titers of anti-E1E2A,B were detected in serum of these patients (Fig. 2B). The majority (80%) exhibited titers  $\geq 1/1000$  with 35% of

## ARTICLE 4

cases  $\geq 1/2000$ . If we compare these results with those of sera obtained from 50 never treated chronic carriers (Group 2: NT), only 7/50 (14%) were found positive. A significant difference ( $p < 0.001$ ) in the anti-E1E2A,B prevalence between C patients (Gr.1) and NT patients (Gr. 2) was observed (Fig. 3A). Similar results were obtained with IgGs purified from a subset of sera (4 NHS, 12 C and 12 NT) belonging to each group of patients (Fig. 3B). This suggests that D32.10 epitope-binding antibodies are statistically associated with control of HCV infection.

The prevalence of anti-E1E2A,B D32.10 epitope-binding antibodies was also determined in sera obtained from 40 non-responders (Group 3: NR), and 52 complete responders (Group 4: CR) who eradicated the virus after antiviral therapies and so achieved a SVR (cf. Table 1). Only 4 out of 40 NR were found positive (10%) at 1/250 dilution (Fig. 4A). In contrast to NR patients, 21 out of 52 CR were positive (40.4%) for D32.10 epitope-binding antibodies (Fig. 4B). One patient (CR80) still under antiviral therapy showed a titer  $> 1/1000$  dilution, and half (10/20) exhibited a titer  $\geq 1/500$  dilution or  $= 1/250$  dilution (Fig. 4B). We noticed that the CR patients found positive (21/52) corresponded to samples taken from 6 months to 1 year after stopping treatment whereas the CR patients negative (31/52, results not shown) corresponded to samples taken from 1 to 5 years after recovery with complete biochemical and virological responses. This suggested that the observed variability of anti-E1E2A,B response in the group of CR patients depended on the time after stopping treatment.

***Longitudinal follow-up study of non-responders (NR) and complete responders (CR) to standard of care antiviral therapy.*** To support such an assertion, follow-up studies were performed among 9 CR patients with SVR (7 of genotype 1 and 2 of genotype 2; 5 males and 4 females; mean age:  $41.7 \pm 0.6$ ) and 7 NR patients (all of genotype 1; 5 males and 2 females; mean age:  $39.7 \pm 3.0$ ) to current standard of care therapy by a combination of PEG-IFN plus

## ARTICLE 4

ribavirin. The first sample (M-1) was taken before starting treatment (Trt). The other serum samples were taken at time 0 of Trt (M0), then 1 (M+1), 2 (M+2), 3 (M+3), 6 (M+6) and 12 (M+12) months after the start of Trt, and 6 months after termination of Trt (6M stop TRT). The mean O.D. values for both groups of patients (NR and CR) were represented on the Fig. 5A for the samples M-1, M0, M+1, M+2, M+3 and M+6 from at least 5 patients in each group. Indeed, the antiviral therapy was often stopped after 6 months of Trt in the NR group. No significant positive results were observed in the NR group. In contrast, the anti-E1E2A,B response was found significantly ( $p < 0.05$ ) positive for all serum samples in the CR group compared to the NR group. Notably, before the start (M-1) and 3 months after the start of Trt (M+3), the difference was highly significant (\*\*\*,  $p < 0.001$ ). We observed that the anti-E1E2A,B response fluctuated over time with a peak at 1 month (M1) after starting Trt. Afterwards, the antibody response decreased (M2), but remained positive (CR3) or even rebounded (CR1, CR2) at 3-6 months (M3, M6) after the start of Trt, as illustrated in Fig. 5B. These results are in accordance with those reported above in one-point studies (cf. Fig. 4A and 4B). ROC curve analysis was conducted to assess the cut-offs of anti-E1E2 antibodies at M-1, M+1, M+3 and M+6 that best distinguished responder from non-responder patients (cf. Fig. 5A) and B). Table 2 indicates that one month prior therapy initiation, a threshold of 1131 best distinguished responders from non-responders with a 100% and 86% PPV and NPV, respectively, meaning that all patients above this threshold subsequently responded to therapy whereas 86% of those below this cut-off failed to achieve SVR. Similar cut-offs were obtained at the other time points with similar predictive values (Table 2).

These longitudinal studies support that the anti-E1E2A,B D32.10 epitope-binding antibody response is present, even before the initiation of antiviral therapy in CR patients, and thus may be predictive for a SVR.

***Sensitivity and specificity of anti-E1E2A,B D32.10 epitope-binding antibodies detection tests.*** When the three biotinylated peptides E1, E2A and E2B were added together on the same solid phase as peptide combination (E1-E2A-E2B, Fig. 6A), similar results were obtained compared to the format using separate peptides on three separate solid phase (E1+E2A+E2B, Fig. 6A). The samples positive for anti-E1E2A,B (CR+ or C) were always found significantly positive compared to samples negative for anti-E1E2A,B (NR and CR-). On the other hand, when the test was performed by coating directly the peptides on the solid phase without involving the streptavidin-biotin system (Fig. 6B), the serum samples from C group were again positive whereas those from NR group negative. However, in both cases a lower significance was observed :  $0.001 < p < 0.01$  (\*\*, Fig. 6A) and  $0.01 < p < 0.05$  (\*, Fig. 6B), respectively, instead of  $p < 0.001$  (\*\*\*). This likely results from steric hindrance in the first case (cf. Fig. 6A) or improper position of peptides in the second case (cf. Fig. 6B) leading to a decreased accessibility of human antibodies to their corresponding composite E1E2A,B D32.10 epitope. The format described and used all along this study thus appeared as the best fit in terms of sensitivity.

For strengthening the specificity of test, a subset of serum samples was analyzed in the absence of peptide (no peptide) or in the presence of two irrelevant peptides (1X and 2X). As shown in the Fig. 6C, ten samples from C group showing O.D.  $> 1.500$  at 1/250 dilution were negative for both peptide-1X and peptide-2X. Only one anti-E1E2A,B-positive sample (C9) was found positive for the peptide-2X whereas the sample C12 showed a very low reactivity with both peptide-1X and peptide-2X (not shown). In conclusion, the anti-E1E2A,B reactivity was highly specific (80 to 90%). Furthermore, in the absence of peptide (no peptide), all the positive samples for E1E2A,B were negative (specificity = 100%). Under these conditions, the mean O.D. values at 1/500 dilution for NHS were  $0.058 \pm 0.022$  (7), and the cut-off value

## ARTICLE 4

= 0.124. The NR patients were indeed negative with O.D. =  $0.105 \pm 0.045$  (5) and the C patients highly positive with O.D. =  $1.196 \pm 0.236$  (12) (positive/negative ratio ~ 10).

### **Discussion**

Although the role of CD4 and CD8 T cells in controlling HCV infection is widely accepted, the role that antibodies may play in HCV clearance is still a matter of debate [15]. Antibodies directed against the E1 and E2 viral envelope proteins may prevent or control viral infection if they are directed against epitopes implicated in virus entry. Therefore, because of the relevant properties of the unique mAb D32.10 [12, 13, 14], the seroprevalence of E1E2A,B-specific D32.10 epitope-binding antibodies was investigated here at different phases of HCV infection. In sera from patients who had spontaneously resolved HCV infection, the prevalence of these antibodies was close to 90% with high titers  $> 1/1000$  in 80% of cases. In contrast, their prevalence in sera from never treated chronic carrier patients was significantly much lower ( $< 15\%$ ,  $p < 0.001$ ). To ensure that high prevalence was well-specific, a subset of samples was tested for reactivity to two irrelevant immunogenic peptides 1X and 2X showing sequence homology from 7% to 20% with the D32.10 epitope sequences E1, E2A and E2B. No reactivity was observed in 80% to 90% of cases. Ten serum samples from patients who had resolved HCV infection and were highly positive for E1, E2A and E2B were found unequivocally negative for both irrelevant peptides. Furthermore, in the absence of any peptide, the mean O.D values for negative controls were much lower leading to cut-off = 0.124 for positive O.D values  $> 1$ . The sensitivity of the test was also investigated by evaluating the proficiency of different formats, involving or not the streptavidin-biotin system for the capture of peptide-antibody complexes, or consisting to coat the three biotinylated peptides together on the same solid phase. In both cases, the positivity was lower but

#### ARTICLE 4

remained significant ( $0.001 < p < 0.01$ ). The principle of the test described and used here was demonstrated to be the best for the detection of D32.10 epitope-binding antibodies in human serum.

Therefore, it appeared very interesting to determine whether the presence of D32.10 epitope-binding antibodies could be predictive for SVR after antiviral therapy in chronic carriers. A transversal study in non-responder patients and in responder patients achieving an SVR revealed that the prevalence of antibodies was 40% in complete responders and only 10% in non-responders with significant difference. However, for such patients undergoing antiviral therapy, it appeared better to perform longitudinal follow-up studies in order to determine when these antibodies appear and their long-term kinetics. Indeed, we demonstrated that the anti-E1E2A,B antibodies were present even before the start of treatment (M-1), showed an exacerbation at M+1, a fluctuating profile with significantly higher values at M+3, followed by progressive decrease over time remaining still positive 1-year after stopping treatment in complete responders. In contrast, the non-responder patients were negative all along the follow-up. ROC curve analysis indicated that one month prior therapy and at the time points: M+1 and M+3 a cut-off of about 1100-1200 (O.D. x1000) was associated with SVR with a 100% and 86-87% PPV and NPV, respectively. Thus, pre-treatment anti-E1E2A,B antibodies may be predictive of the response to HCV treatment.

Overall, our data show that D32.10 epitope-binding antibodies and their corresponding epitope E1E2A,B play a major role in natural clearance of HCV infection, in contrast to AP33-like antibodies [10, 11]. Supporting that, similar results were obtained by using purified IgG fractions, minimizing the possible effect of serum components. In addition, the reactivity was positive up to 1/2000 dilution of serum samples, and independent of genotype 1 or non-1 of HCV strains. Identifying potentially neutralizing antibodies with epitopes conserved across all isolates of HCV is essential for the development of a successful vaccine capable to elicit

## ARTICLE 4

protective humoral immune response. Up to now, none of parameters such as HLA, HCV genotype, co-infection with human immunodeficiency virus (HIV), gender, race or advanced age, even if they seem to influence the clinical course of disease, could accurately predict spontaneous resolution [2]. Only a strong and multispecific cellular immune response was now considered to be an important host factor for spontaneous viral eradication [16]. Recently, low baseline IFN $\gamma$ -Inducible Protein-10 (IP-10 or CXCL10) levels were shown to be significantly associated with SVR and predictive of the response during treatment in patients infected with HCV genotypes 1 and 4 [17]. Still more recently, genetic variation in IL28B, which encodes the type II IFN- $\lambda$ 3, was shown to be associated with spontaneous treatment-induced clearance of HCV [18]. However, all these factors reflect the host immune response. At present, serum HCV RNA levels below 2 million copies/ml ( $\approx$ 800,000 IU/ml) and a rapid decrease ( $\geq 3 \log_{10}$ ) of viral load after the onset of treatment are the only viral factors associated with favourable treatment results. Thus, analysis of anti-E1E2A,B D32.10 epitope-binding antibodies in HCV-infected patients may prove helpful in decision-making for clinicians regarding pharmaceutical intervention and thus highly recommendable to predict rapid viral response (RVR).

For the first time, our observations indicate that induction of these likely neutralizing antibodies appears to closely correlate with therapeutic outcome and complete elimination of HCV in contrast with several previous reports [5-9]. In these last studies, viral escape from antibody-mediated neutralization occurred because the neutralizing antibodies identified were directed against the HVR1 of the E2 envelope protein. It resulted in interplay of the viral E2/HVR1 with high density lipoproteins (HDL) and SR-BI (scavenger receptor-BI), an HDL receptor, which mediates protection from cross-neutralizing antibodies present in sera of both acute and chronic HCV-infected patients [5, 7]. Here, the detected anti-E1E2A,B antibodies target unique highly conserved distinct regions outside the HVR1.

## ARTICLE 4

In conclusion, we demonstrated the clinical relevance of anti-E1E2A,B D32.10 epitope-binding humoral immune response in patients infected with HCV. We identified that the E1(297-306)-E2A(480-494)-E2B(613-621) D32.10 epitope was recognized by human antibodies only present in patients who resolved HCV infections spontaneously or under antiviral therapy. This suggests that E1E2A,B-specific antibodies are neutralizing, predictive for complete virus elimination and may represent a new relevant prognostic marker in serum. These findings have implications not only for the HCV diagnosis but also for the design of novel immunotherapeutic and preventive strategies against HCV.

### References

1. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007;13:2436-2441.
2. Santantonio T, Wiegand J, Gerlach JT. Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. *J Hepatol.* 2008;49:625-633.
3. Boonstra A, van der Laan LJW, Vanwolleghem T, Janssen HLA. Experimental models for hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2009;50:1646-55.
4. Gondeau C, Pichard-Garcia L, Maurel P. Cellular models for the screening and development of anti-hepatitis C virus agents. *Pharmacology & Therapeutics* 2009;124:1-22.
5. Pestka JM, Zeisel MB, Bläser E, Schürmann P, Bartosch B, Cosset FL, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:6025-30.

#### ARTICLE 4

- 6 Lavillette D, Morice Y, Germanidis G, Donot P, Soulier A, Pagkalos E, et al. Human serum facilitates hepatitis C infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:6023-6034.
- 7 Meunier JC, Engle RE, Faulk K, Zhao M, Bartosch B, Alter H, et al. 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*. 2005;102:4560-4565.
- 8 Boo I, Fischer AE, Johnson D, Chin R, Giourouki M, Bharadwai M, et al. Neutralizing antibodies in patients with chronic hepatitis C infection treated with (Peg)-interferon/ribavirin. *J Clin Virol*. 2007;39:288-294.
- 9 Dreux M, Pietschmann T, Granier C, Voisset C, Ricard-Blum S, Mangeot PE, et al. High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem*. 2006;281:18285-18295.
- 10 Tarr AW, Owsianka AM, Timms JM, McClure CP, Brown RJ, Hickling TP, et al. Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. *Hepatology*. 2006;43:592-601.
- 11 Tarr AW, Owsianka AM, Jayaraj D, Brown RJ, Hickling TP, Irving WL, et al. Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *J Gen Virol*. 2007;88:2991-3001.
- 12 Petit MA, Jolivet-Reynaud C, Peronnet E, Michal Y, Trépo C. Mapping of a conformational epitope shared between E1 and E2 on the serum-derived human hepatitis C virus envelope. *J Biol Chem*. 2003 ;278:44385-44392.

#### ARTICLE 4

- 13 Petit MA, Lièvre M, Peyrol S, De Sequeira S, Berthillon P, Ruigrok RW, et al. Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. *Virology* 2005;336:144-153.
- 14 Ndongo N, Rechoum R, De Sequeira S, Zoulim F, Trépo C, Drouet E, et al. Inhibition of the binding of HCV serum particles to human hepatocytes by E1E2-specific D32.10 monoclonal antibody. *J Med Virol.* 2009;81:1726-1733.
- 15 Ziesel MB, Cosset FL, Baumert TF. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2008;48:299-307.
- 16 Lucas M, Ulsenheimer A, Pfafferot K, Heeg MH, Gaudieri S, Gruner N, et al. Tracking virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells during and after acute hepatitis C infection. *PLoS ONE* 2(7): e649. doi:10.1371/journal.pone.0000649.
- 17 Lagging M, Romero AI, Westin J, Norkrans G, Dhillon AP, Pawlotsky JP, et al. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology* 2006;44:1617-1625.
- 18 Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'hUigin, C, et al. Genetic variation of IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461:798-801.

## Figure Legends

**Figure 1. Determination of the cut-off value.** (A) Five NHS were tested at different dilutions: 1/50, 1/100, 1/250, 1/500 and 1/1000. The box corresponds to standard dilutions selected: 1/250 and 1/500. (B) The cut-off values for these 2 dilutions were calculated from the mean O.D. values obtained for 17 NHS, and corresponded to the mean O.D. values + 3 S.D. The mean values for E1, E2A and E2B  $\pm$  S.D. were represented.

**Figure 2. Seroprevalence of anti-E1E2A,B D32.10 epitope-binding antibodies with high titers in spontaneously cured patients (C, Gr. 1).** (A) The mean O.D. values for the total 52 serum samples from Gr.1. Series 1 = 22 patients spontaneously cured of a past infection ( $\geq$  10 yrs). Series 2 = cohort of 30 patients considered as spontaneously cured whose date of acute infection was unknown. The cut-off value was 0.708 for 36 negative serum controls. (-), negative samples under the cut-off value. (B) Anti-E1E2A,B titer distribution for the 46 out of 52 serum samples positive for anti-E1E2A,B (cf. Fig. 2A). The y'axis represents the number of patients for each serum dilution.

**Figure 3. Significant prevalence of human anti-E1E2A,B response in spontaneously cured patients (C, Gr. 1) compared to never treated chronic carriers (NT, Gr. 2).** (A) The human anti-E1E2A,B response was determined in 102 HCV patients (50 NT and 52 C) and 36 negative controls (NHS). Levels of antibodies as detected with specific ELISA are depicted as scatter diagram and statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 4 software. The P value was  $<0.001$  and therefore the difference between the NT and C groups was highly significant \*\*\*. (B) Reactivity of human IgGs purified from 4 NHS, and 12 sera from patients belonging to either Gr. 1 (C) or Gr. 2 (NT) towards the E1E2A,B D32.10 epitope. Same significant difference in the anti-E1E2A,B prevalence between Gr.1 and Gr. 2 was observed (\*\*\*,  $p<0.001$ ). The results were expressed as the mean O.D. values  $\pm$  S.D for each group of patients.

**Figure 4. Seroprevalence of anti-E1E2A,B D32.10 epitope-binding antibodies in non responders (NR, Gr. 3) and complete responders (CR, Gr. 4).** (A) The mean O.D. values for the total 40 serum samples obtained from NR patients (Gr. 3) were represented. The cut-off value was 0.960 for 17 NHS. \*, Only 4 samples were positive and showed values greater than the cut-off. (B) Twenty one out of the total 52 serum samples obtained from CR patients (Gr. 4) which were positive for anti-E1E2A,B were represented. The cut-off value was 0.830 for 12 NHS. \*\*, titer > 1/1000 dilution. \*, titer  $\geq$  1/500 dilution. The others exhibited a titer = 1/250 dilution.

**Figure 5. Longitudinal follow-up study of NR and CR to standard of care antiviral therapy.** (A) This study included 8 CR and 6 NR at M-1 corresponding to 1 month before starting treatment (Trt), 7 CR and 5 NR at M0 (Start of Trt), 8 CR and 7 NT at M+1 (1 month after starting Trt), 6 CR and 6 NR at M+2 (2 months after starting Trt), 8 CR and 7 NT at M+3 (3 months after starting Trt), and 8 CR and 6 NR at M+6 (6 months after starting Trt). The mean O.D. values for E1E2A,B  $\pm$  S.D. were represented at each time for each group. The statistical significance between NR and CR groups were calculated with the student' test and represented as \*\* =  $0.001 < p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ . The results obtained at M-1 and M+3 were the most significant (circle). (B) Representative kinetics for 3 non responder patients NR1, NR2, NR3 (mean age:  $39.7 \pm 3.0$ ; sexe: male; genotype 1) and 3 complete responder patients CR1, CR2, CR3 (mean age:  $41.7 \pm 0.6$ ; sexe: female; genotype 1). For each time point, the mean O.D for E1, E2A and E2B was represented. Squares correspond to time points for which ROC curve analysis was conducted to assess the cut-offs of anti-E1E2 antibodies (cf. Table 2). 6M stop TRT, 6 months after stopping treatment.

**Figure 6. Sensitivity and specificity of anti-E1E2A,B detection tests.** (A) The 3 biotinylated peptides E1, E2A and E2B were added together on the same solid phase at a concentration of 5  $\mu\text{g/ml}$  each (E1-E2A-E2B, ) by comparison with the format previously used where the 3 peptides were coated on 3 separate solid phase (E1+E2A+E2B, ). Six serum samples from NHS as control, 10 from anti-E1E2-negative NR/CR- (7/3) and 10 from anti-E1E2-positive CR+/C (4/6) were analyzed. (B) Direct coating of the 3 non-biotinylated peptides () compared with coating of peptides via the streptavidin-biotin system () on 3 separate solid phase. Five serum samples from NHS and 5 from each patients' group (NR negative for anti-E1E2 or C positive for anti-E1E2) were tested. The mean O.D. values  $\pm$  S.D. were represented. \*\*\*,  $p < 0.001$ . \*\*,  $0.001 < p < 0.01$ . \*,  $0.01 < p < 0.05$ . (C) Serum samples from 10 patients C (Gr. 1) were tested in the absence of peptide (no peptide), in the presence of E1, E2A or E2B represented as the mean values E1E2A,B, or in the presence of either peptide-1X or peptide-2X as irrelevant peptides.

## ARTICLE 4

**Table 1. Characteristics of 4 selected groups of HCV-antibody-positive patients**

Serum samples [patient number] <i>Infection type</i>	Gr. 1 : <b>Cured</b> [C, 52] <i>Resolved</i>	Gr. 2 : <b>Chronic carriers</b> [NT, 50] <i>Chronic</i>	Gr. 3 : <b>Non Responders</b> [NR, 40] <i>Chronic</i>	Gr. 4 : <b>Complete Responders</b> [CR, 52] <i>Chronic</i>
Genotype (n), %	1 (25), 91 non 1 (1), 9 n. a. (26)	1a, b (28), 58 non 1 (20), 42 n. a. (2)	1a, b (28), 76 non 1 (9), 24 n. a. (3)	1 (24), 53 non 1 (21), 47 n. a. (7)
HCV RNA titre (IU/ml) (n), %	negative	5.8 log <sub>10</sub> IU/ml (range: 3.4-7.8) (44), 94 bDNA neg. (3), 6 n. a. (3)	5.7 log <sub>10</sub> IU/ml (range: 4.7-6.9) (27), 77 PCR pos. (6), 17 PCR neg. (2), 6 n. a. (5)	Negative
Transaminases (n), %	normal	Elevated (26), 54 1.4 x ULN (range: 1-5) Normal (22), 46 n. a. (2)	Elevated (28), 76 2 x ULN (range: 1-9) Normal (9), 24 n. a. (3)	Normal
Metavir, A/F (n), %	no	≤ A1 (27), 77 A2 (8), 23 n. a. (15)  ≤ F1 (27), 64 ≥ F2 (16), 36 Cirrhosis (1) n.a. (7)	≤ A1 (17), 53 ≥ A2 (15), 47 n. a. (8)  F1 (8), 25 ≥ F2 (24), 75 cirrhosis (5) n. a. (8)	≤ A1 (24), 56 ≥ A2 (19), 44 n. a. (9)  ≤ F1 (13), 30 ≥ F2 (30), 70 n. a. (9)
Antiviral Therapies	no	no	PEG-IFN +/- RBV (30), 77 Tritherapy (9)  n. a. (1)	PEG-IFN + RBV (40), 93 Tritherapy (2) RBV monotherapy (1) n. a. (9)

PEG-IFN, Pegylated interferon; RBV, Ribavirin; ULN, upper limit of normal;  
IU, International Unit; pos., positive; neg., negative; n. a., not available.

## ARTICLE 4

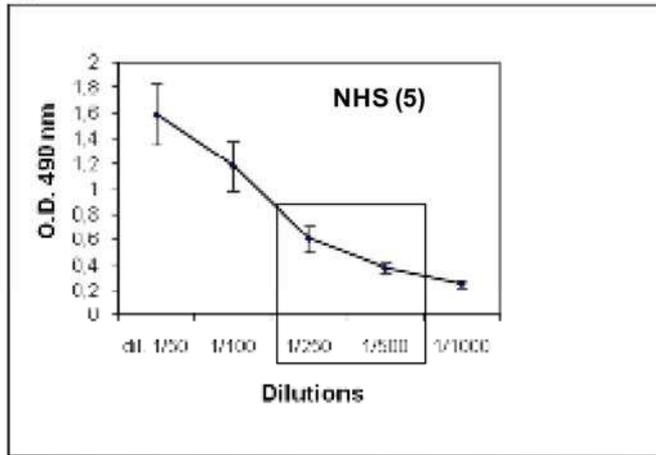
**Table 2. Predictive values for SVR to standard of care antiviral therapy (ROC curve)**

Diagnostic value Patients' groups ( <i>n</i> ) Time	SVR Follow-up CR/NR (16)			
	M-1	M+1	M+3	M+6
Cut-off (O.D. x 1000)	1131	1227	1161	1060
AUC (area under the ROC curve → 1)	0.979	0.982	0.964	0.938
<i>p</i> (probability)	0.003	0.002	0.003	0.007
Sensitivity (%)	87.5	87.5	87.5	87.5
Specificity (%)	100	100	100	83.3
PPV (%)	100	100	100	87.5
NPV (%)	85.7	87.5	87.5	83.3

SVR = sustained viral response; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value. CR = complete responders; NR = non responders. M-1 = one month before starting treatment (Trt); M+1 = at 1 month; M+3 = at 3 months; M+6 = at 6 months after starting Trt.

ARTICLE 4

A.



B.

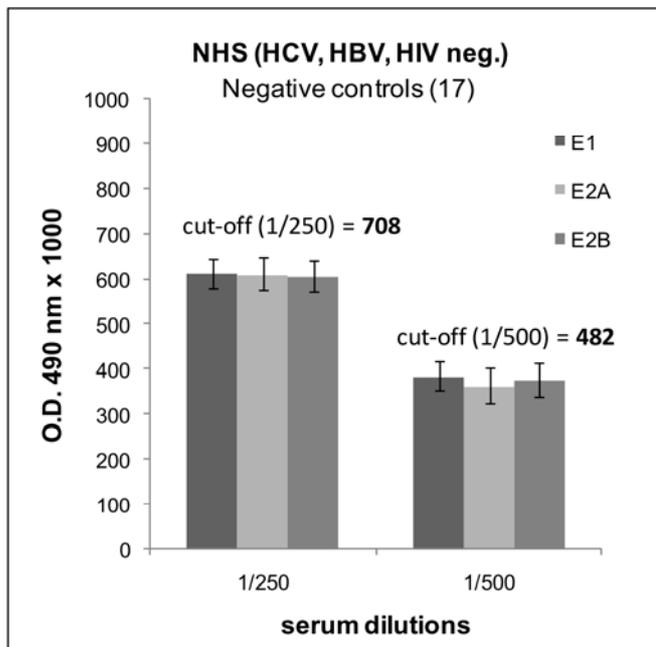
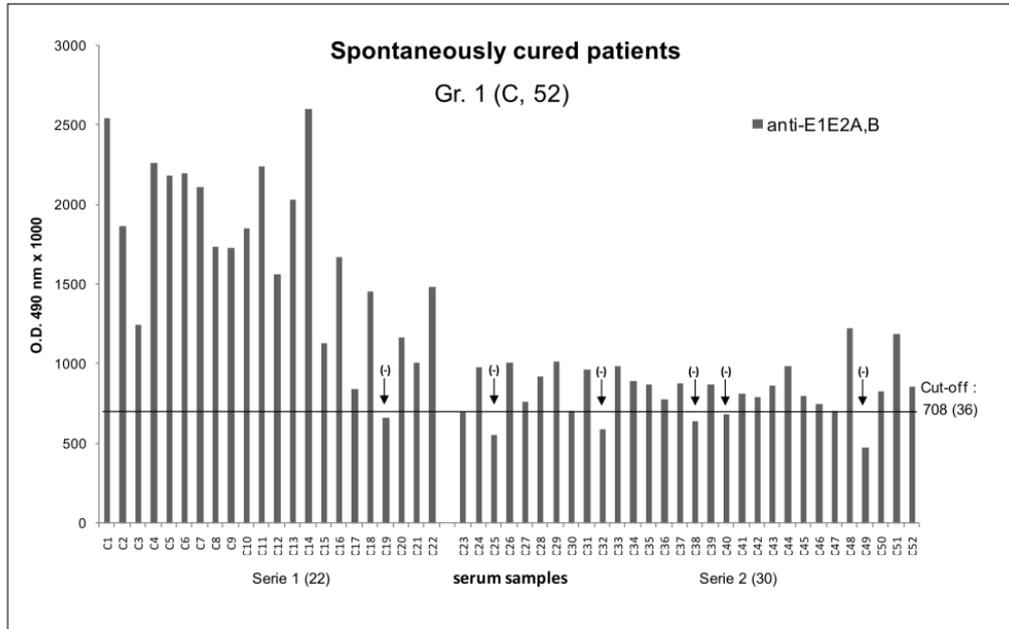


Figure 1

ARTICLE 4

A.



B.

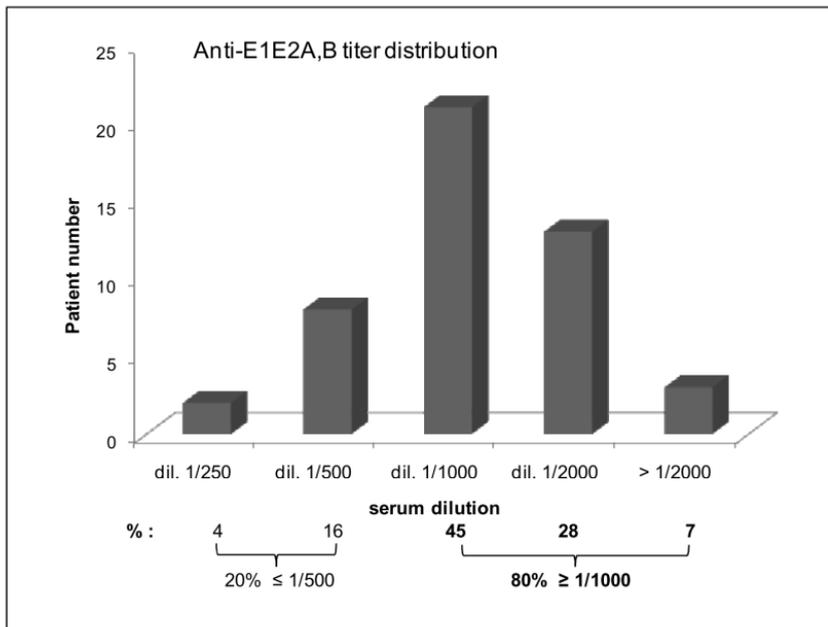
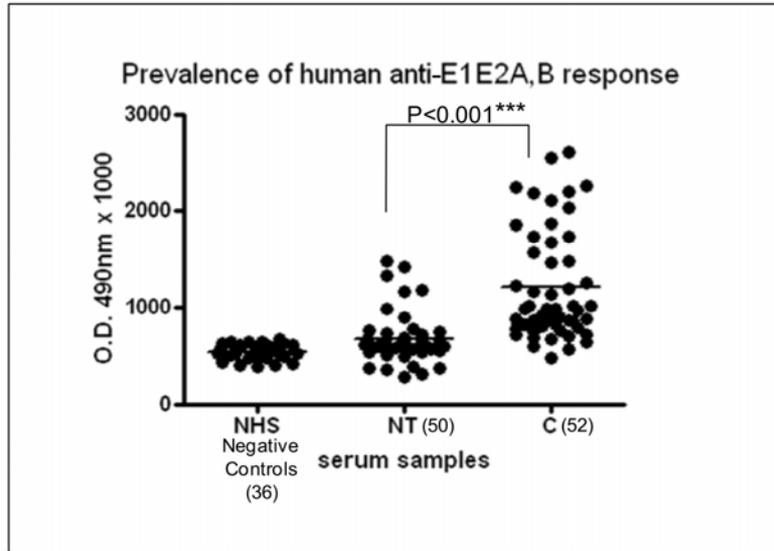


Figure 2

A.



B.

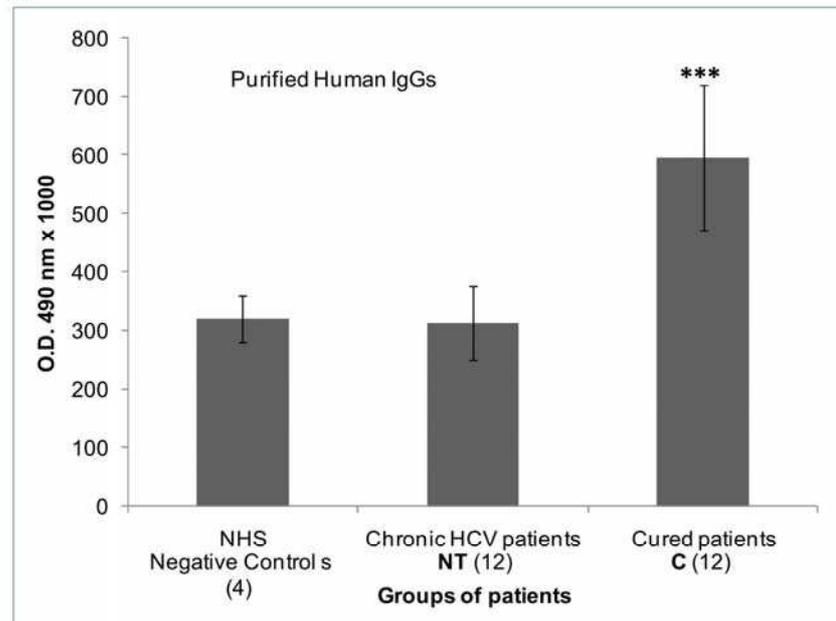
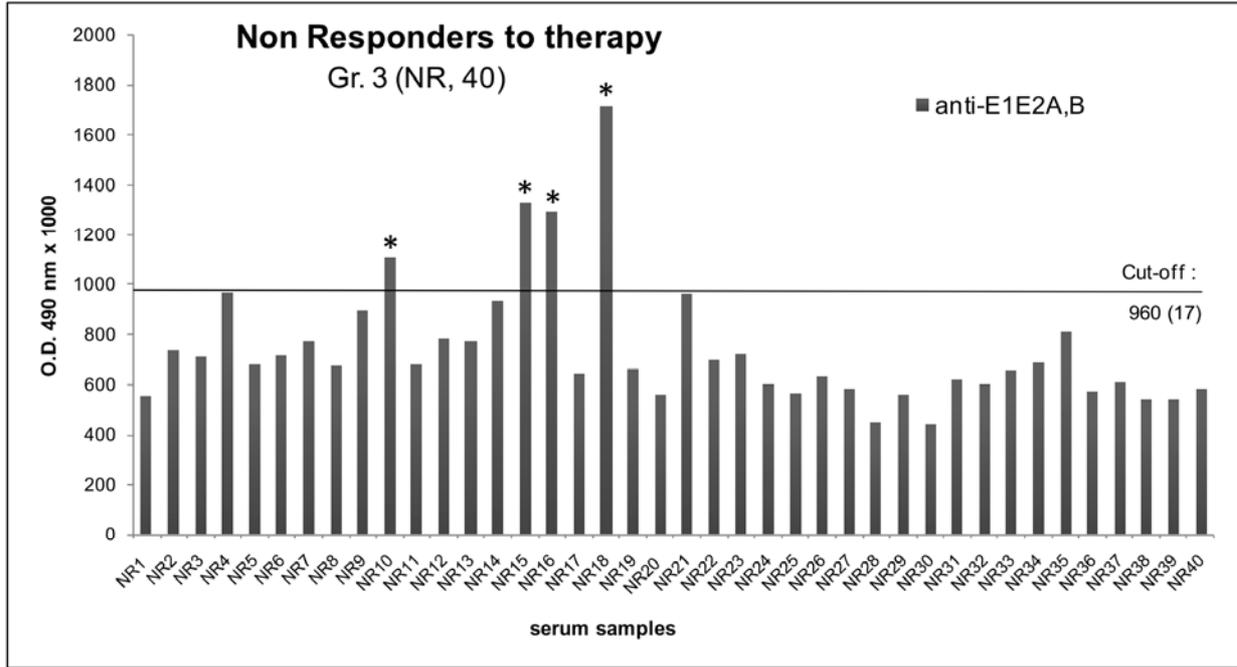


Figure 3

A.



B.

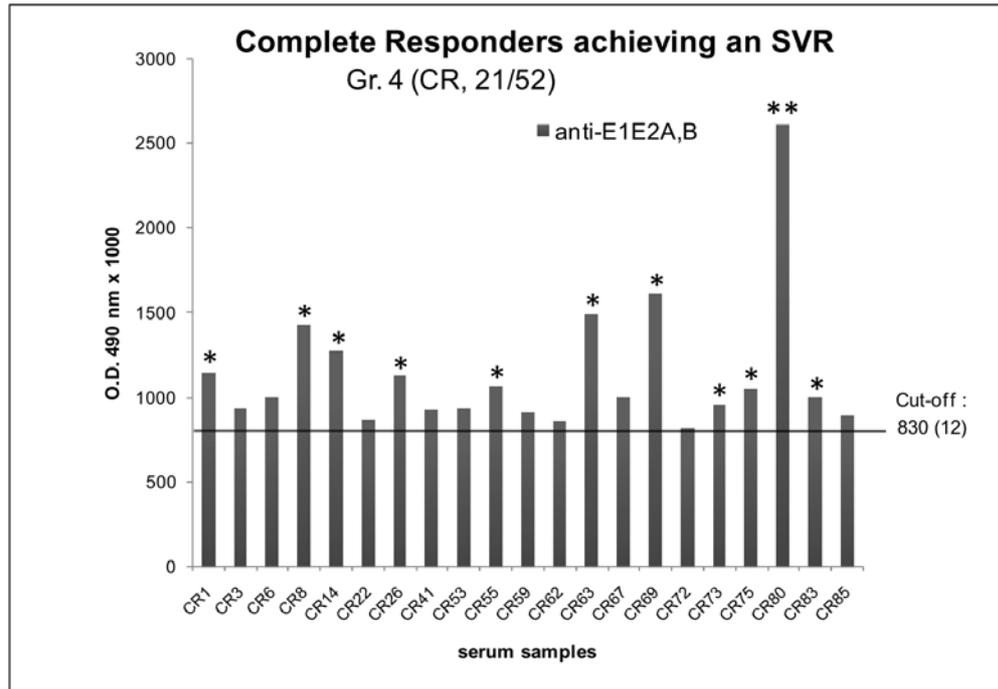
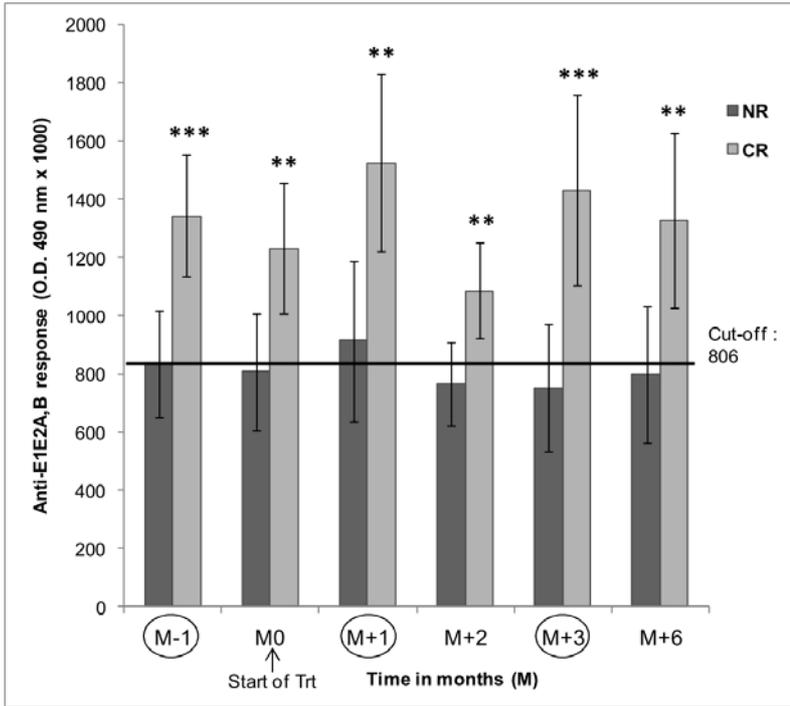


Figure 4

A.



B.

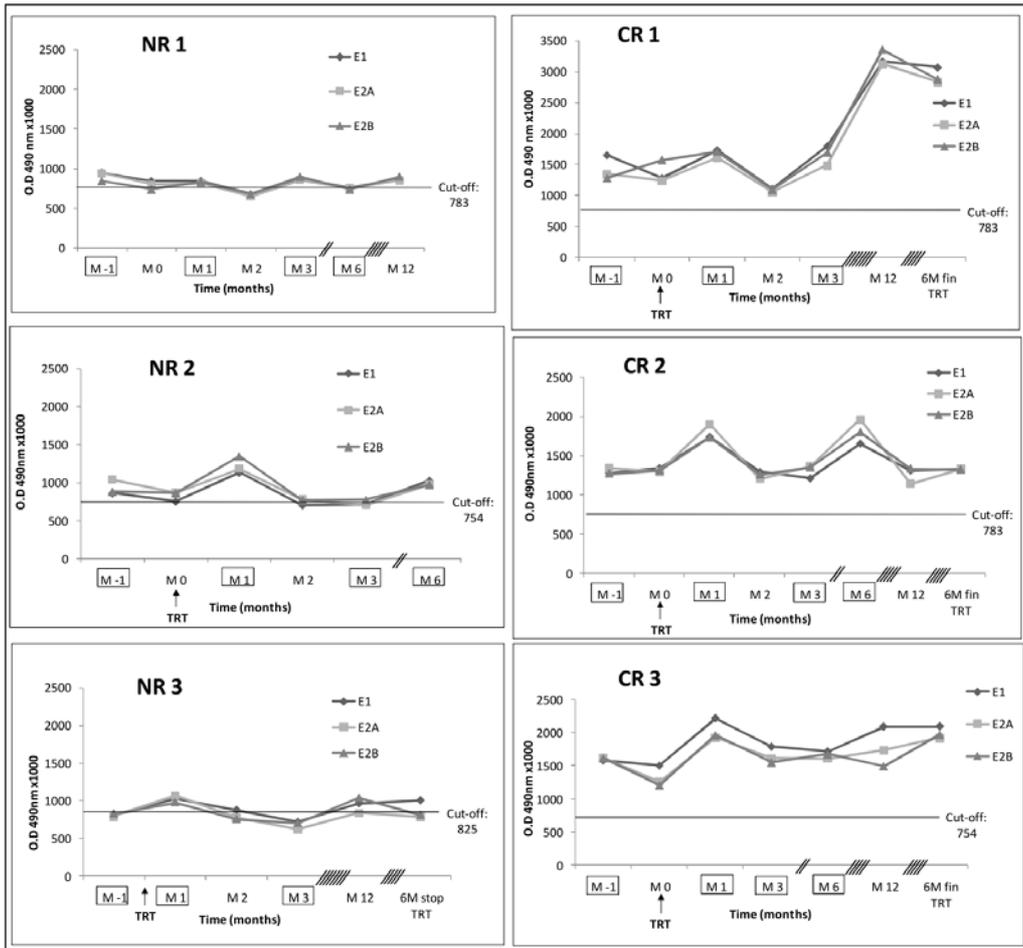


Figure 5

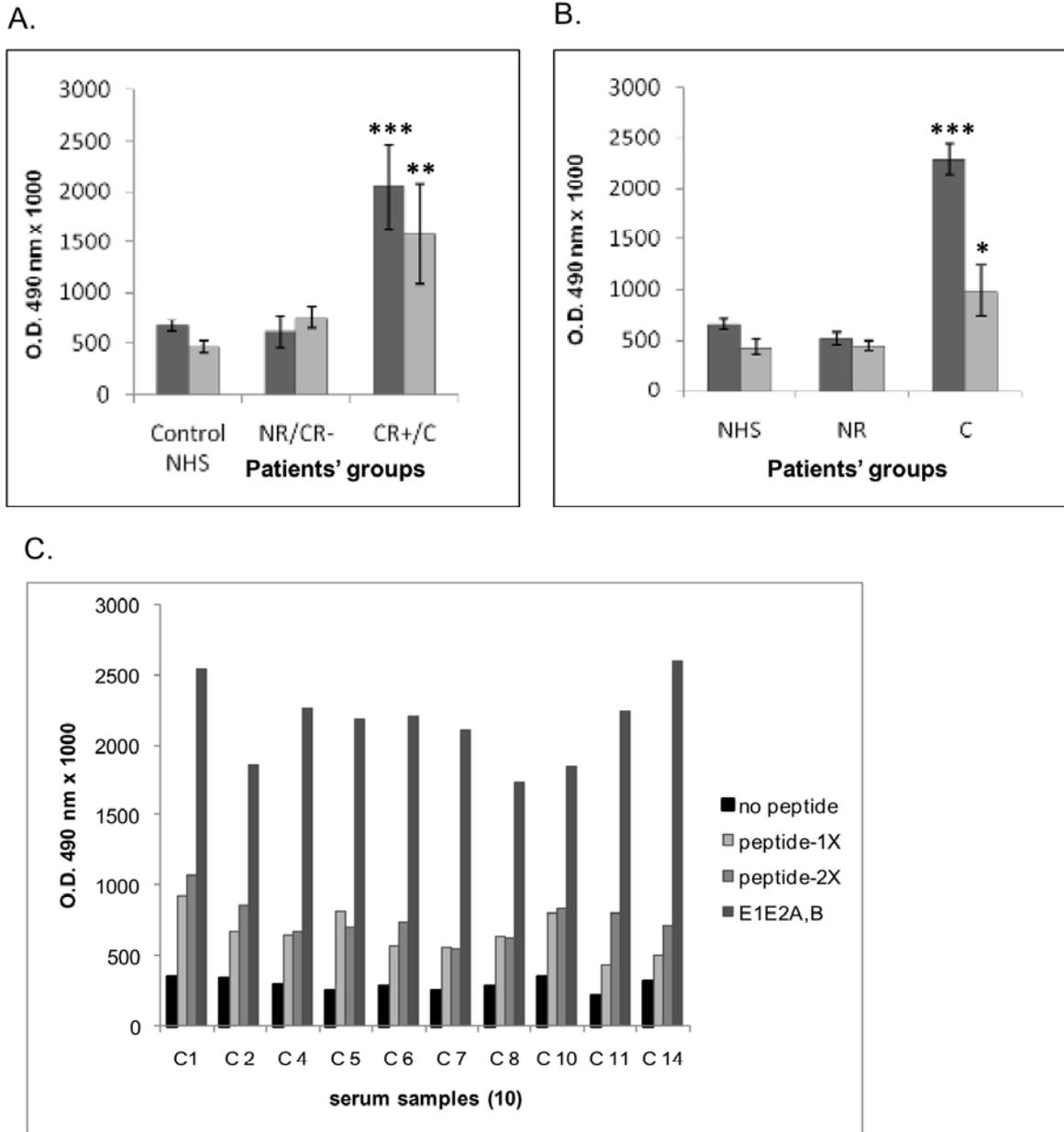


Figure 6



## ***CHAPITRE IV - DISCUSSION***

---



## DISCUSSION

L'infection par le HCV est à l'origine de la production de très nombreux anticorps, dirigés à la fois contre des épitopes des protéines structurales et non structurales du virus. Le rôle de ces anticorps dans le contrôle de l'infection est mal connu. La production d'anticorps neutralisants est indispensable à la neutralisation des particules virales libres et à l'inhibition de leur pénétration dans les cellules permissives. Lorsque le virus pénètre dans la cellule, les réponses humorales peuvent aussi contribuer à limiter la transmission virale de cellule à cellule. Leur effet sur les virus intra-cellulaires est lié à la cytotoxicité dépendante du complément et à la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). Farci et collaborateurs ont été les premiers à avoir décrit la présence d'anticorps neutralisants anti-HCV chez le chimpanzé, ceux-ci étaient dirigés contre des épitopes situés au niveau de la région HVR1 de E2. Par la suite, plusieurs données ont suggéré que les anticorps neutralisants ont un impact réel sur l'infection par le HCV. Ainsi, une meilleure connaissance des aspects moléculaires de l'interaction entre le virus et les anticorps neutralisants devrait faciliter la compréhension de l'histoire naturelle de l'hépatite C et permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et prophylactiques.

Des progrès remarquables ont été réalisés ces dernières années avec le développement de modèles d'études *in vitro* qui ont permis de déterminer les cibles de la réponse humorale contre le HCV. Le modèle des HCVpp a été le premier modèle permettant d'identifier des anticorps capables de neutraliser *in vitro* l'infectivité des pseudo-particules dans ce système. Cette première étude fonctionnelle n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'anticorps neutralisants chez les patients qui guérissent spontanément. De ce fait, ces anticorps détectés ne confèrent pas une immunité stérile et ne sont donc pas neutralisants.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la réponse humorale neutralisante au cours de l'hépatite C et plus précisément sur le rôle potentiellement neutralisant de l'anticorps monoclonal D32.10. C'est un anticorps qui a été isolé puis caractérisé dans notre équipe et qui pourrait avoir un intérêt clinique majeur. Il est spécifique du HCV et reconnaît un déterminant antigénique discontinu, composé d'un site dans la protéine E1 (297-306) et de 2 sites dans E2 (480-494) (613-621) [Petit et al., 2003]. Cet épitope D32.10 est exprimé à la surface des HCVsp naturelles [Petit et al., 2005] et est impliqué dans les interactions HCV-cellule *via* les

## DISCUSSION

sites de liaison avec CD81 et les GAG [Olenina et al., 2005; Rothwangl et al., 2008; Yagnik et al., 2000]. La connaissance de la structure du complexe d'enveloppe E1E2, exprimé à la surface des particules virales C naturelles, est essentielle. C'est pourquoi il est important d'étudier les interactions entre le HCV sérique et ses cellules cibles, les hépatocytes humains et les mécanismes de la neutralisation dans un tel système.

### **L'anticorps monoclonal D32.10 présente des propriétés neutralisantes in vitro**

#### ***Le D32.10 inhibe l'interaction des HCVsp avec les cellules hépatocytaires***

Dans la première étude, un test *in vitro* de *cell-binding* [Godard et al., 1992] a été développé puis adapté aux particules HCV. Cette approche consiste en la fixation d'iode 125 sur la protéine ligand [McConahey and Dixon, 1966] et permet de mesurer ensuite le marquage spécifique des HCVsp fixées à différentes concentrations du radioligand. L'utilisation de concentrations croissantes de ligand radioactif permet de construire une courbe de saturation. A partir de cette courbe, il est possible de déterminer la constante de dissociation (Kd) qui traduit l'affinité du ligand pour son récepteur et le nombre maximal de sites (Bmax) de fixation. Kd et Bmax sont déterminés à partir d'une transformation des données de la courbe de saturation, transformation dite de Scatchard, qui représente la relation entre la quantité de ligand fixé de façon spécifique (au niveau du récepteur) et le rapport radioligand fixé/radioligand libre. Nous avons montré au cours de cette étude qu'il existe une fixation spécifique et saturable entre les HCVsp et les cellules d'hépatome (Huh-7 et HepaRG). Cette interaction entre les HCVsp et les cellules prolifératives Huh-7 et HepaRG se ferait selon deux types d'interaction : une interaction de haute affinité (HA) avec un Kd de 0,1 à 0,5 µg/ml, et une interaction de basse affinité (BA), avec un Kd de 5-10 µg/ml. L'interaction HA est plus difficilement identifiable sur les cellules Huh-7 qui semblent exposer préférentiellement des sites de liaison BA. En revanche, seules les interactions HA ont été identifiées clairement entre les HCVsp et les cellules HepaRG différenciées suggérant que ces interactions seraient plus fortes et spécifiques lorsque les hépatocytes sont polarisés [Parent et al., 2004]. Ces deux types d'interactions peuvent être facilement identifiés avec les cellules HepaRG au stade prolifératif.

## DISCUSSION

En outre, lorsqu'on utilise sélectivement les particules HCVsp enveloppées (E1E2/D32.10 positives) avec les cellules HepaRG prolifératives dans des études de *binding*, seules les interactions HA (Kd très faible <0,1 µg/ml) sont observées. Ces résultats suggèrent que les interactions spécifiques HA impliquent préférentiellement l'épitope E1E2 exprimé à la surface des particules HCVsp et reconnu par le D32.10 et les récepteurs exprimés sur les cellules HepaRG différenciées. Dans nos mains, l'anticorps anti-E1E2/D32.10 a été montré capable d'inhiber spécifiquement l'interaction entre HCVsp et Huh-7 ou HepaRG avec une IC50 de 0,5 µg/ml, et serait encore plus efficace lorsque la population virale enveloppée est sélectivement utilisée (IC50 <0,5 µg/ml). Lorsque nous utilisons dans ce système un anticorps irrelevant, aucun ou un faible effet inhibiteur (10-15%) est observée pour des concentrations < 10 µg/ml, alors qu'un effet inhibiteur de 25-40% peut être observé pour des concentrations > 10 µg/ml. Ceci suppose que l'anticorps monoclonal D32.10 présente un effet inhibiteur très spécifique sur les interactions entre les HCVsp et les cellules hépatocytaires.

Dans cette étude, nous avons aussi testé l'activité inhibitrice de l'anticorps monoclonal AP33 dans ce système puisque cet anticorps a été montré capable de neutraliser l'entrée et l'infectiosité virales dans le système des HCVpp et des HCVcc [Tarr et al., 2006]. Un effet inhibiteur dose dépendant a été observée seulement pour des concentrations relativement élevées (> 10 µg/ml). L'anticorps monoclonal AP33 présente une inhibition maximale de l'ordre de 65% pour une concentration de 100 µg/ml avec une IC50 de 50 µg/ml dans notre système. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus précédemment dans le système des HCVcc, puisqu'il a été montré qu'en présence d'AP33 à 50 µg/ml, l'infectivité des HCVcc est réduit de 80%. En revanche, aucun ou un très faible effet inhibiteur significatif mais non dose-dépendant (<30%) a été observée avec l'AP33 à des concentrations plus faibles. Nous noterons que seuls les effets observés à des concentrations inférieures à 2 µg/ml sont hautement spécifiques pour inhiber efficacement les interactions HCVsp et cellules.

En somme, nous avons montré au cours de cette étude que l'anticorps monoclonal D32.10 est capable d'inhiber très efficacement (IC50 < 1µg/ml) les interactions de haute affinité entre les particules HCV sériques (génotype 3 or 1b) et les cellules Huh-7 ou les HepaRG hautement différenciés. Cet effet inhibiteur résulte vraisemblablement de l'implication de l'épitope unique formé par les trois régions hautement conservées dans

## DISCUSSION

les protéines E1 et E2, reconnu par le D32.10 et exprimé à la surface des particules HCVsp.

### ***Le D32.10 est capable d'inhiber les phases précoces de l'infection des cellules HepaRG par les HCVsp***

Le développement d'un système de propagation du HCV en culture cellulaire, HCVcc [Wakita et al., 2005] a été une avancée majeure permettant l'étude du cycle complet de réplication du HCV. Toutefois, ce modèle présente quelques limitations allant de la restriction au génotype 2a et de l'utilisation exclusive de cellules d'hépatome, Huh-7 et dérivées, qui sont déficientes pour la réponse immunitaire innée [Lanford et al., 2003; Preiss et al., 2008; Sumpter et al., 2005]. Au cours de ma thèse, nous avons développé un nouveau système d'infection *in vitro* proche de l'infection naturelle C *in vivo* en vue d'étudier l'effet neutralisant de l'AcMo D32.10. Ainsi, les cellules HepaRG qui sont des cellules progénitrices du foie présentant des propriétés morphologiques et fonctionnelles proches des hépatocytes humains normaux [Gripon et al., 2002; Parent et al., 2004] ont été infectées avec des particules virales C dérivées de sérum de patients [Petit et al., 2005]. Ces cellules HepaRG expriment la tétraspanine CD81, récepteur potentiel du HCV via la protéine d'enveloppe E2 aussi bien que les récepteurs aux lipoprotéines, SR-BI et LDL-R qui ont été montrés également impliqués dans l'entrée du virus. Après infection des cellules par les particules HCVsp, l'ARN du HCV est détecté jusqu'à J4 post infection (p.i), ce qui reflète l'adsorption d'une partie de l'inoculum sur les cellules qui est ensuite relarguée dans le surnageant. L'absence de détection de l'ARN du HCV à J11 p.i suggère une complète élimination du virus qui n'a pas pénétré dans les cellules. L'apparition de signaux détectables entre J18 et J60 p.i avec un pic entre J39 et J46 reflète une synthèse *de novo* d'ARN viral secrété sous forme particulaire au stade différencié, en l'absence de tout repiquage des cellules. En effet, les cellules HepaRG ont la particularité de pouvoir se différencier spontanément *in vitro* une fois arrivées à confluence (entre 14 et 20 jours après ensemencement).

Nous avons montré pour la première fois, que les cellules HepaRG sont infectables par des particules HCV sériques. Ces cellules au stade prolifératif présentent un profil d'hépatocyte immature caractérisé par un phénotype épithélial non polarisé et une résistance des cellules à l'apoptose [Parent and Beretta, 2008]. Cet état prolifératif des

## DISCUSSION

cellules pourrait favoriser l'établissement de l'infection. La production de particules virales contenant l'ARN du HCV est observée ensuite quand les cellules sont en phase de différenciation (à partir de J21 après ensemencement). A ce stade, les cellules HepaRG présentent un phénotype d'hépatocyte mature avec augmentation de la traduction des protéines et polarisation de la cellule qui permettraient ainsi la réplication et la propagation du virus. Ces observations sont appuyées par les résultats d'une étude récente qui ont montré que les cellules Huh-7 cultivées en 3 dimensions (3D) qui présentent alors un phénotype hépatocytaire différencié seraient permissives à l'infection par les HCVcc [Sainz et al., 2009a; Sainz et al., 2009b].

En utilisant l'AcMo anti-E1E2/D32.10, nous avons caractérisé les particules virales présentes dans le surnageant de culture des cellules HepaRG infectées. Par sédimentation en gradient d'iodixanol du matériel viral concentré, nous avons identifié une population majoritaire qui sédimente à une densité de 1,06-1,12 g/ml. Cette population ARN viral (+) exprime les protéines d'enveloppe E1E2, reconnues par l'AcMo D32.10, associées aux apolipoprotéines B et E. Le maximum de détection de l'ARN viral et de l'antigénicité E1E2 est observé dans la fraction correspondant à une densité égale à 1,08 g/ml. Des résultats similaires ont été obtenus après sédimentation des particules HCV dérivées de sérum de patients (Ndongo et al., RNH-ANRS 01/2010). Par contre, comme il a été montré précédemment [Petit et al., 2005], cette population virale se retrouve à une densité de 1,17-1,20 g/ml après sédimentation en gradient de saccharose. Ainsi, l'hétérogénéité de la densité des particules HCV dépend de la technique de séparation et aussi de la nature de la matrice utilisée pour la constitution des différents gradients (iodixanol ou saccharose). En effet, l'iodixanol permettrait une meilleure préservation des complexes lipoprotéiques de faible densité alors que le saccharose induirait un démasquage des complexes d'enveloppe E1E2 sans altérer leur structure permettant ainsi leur reconnaissance par les anticorps anti-E1E2A,B/D32.10.

Par immunohistochimie avec l'AcMo anti-E1E2/D32.10, nous avons montré que les antigènes d'enveloppe E1 et E2 du HCV étaient localisés au niveau cytoplasmique dans les cellules HepaRG infectées avec environ 60% de cellules positives à J25 p.i. Ce pourcentage diminue ensuite à J53 p.i. avec 30 % de cellules infectées. L'antigène de capside du HCV a également été détecté avec une localisation similaire dans les cellules

## DISCUSSION

infectées à ces différents temps. Ainsi, nous avons mis en évidence l'expression de l'épitope E1E2 reconnu par l'AcMo D32.10 dans les cellules HepaRG infectées.

Nous avons également montré que les particules virales produites par les cellules HepaRG infectées et récupérées à J25 p.i sont infectieuses puisqu'elles sont capables de réinfecter des cellules HepaRG naïves avec à nouveau une amplification du signal en RT-PCR en phase de différenciation.

D'autre part, nous avons montré une persistance de l'infection puisque des cellules HepaRG infectées congelées en phase tardive (J53 p.i) et remises en culture sont capables de produire à nouveau des particules virales après 1 (P1) ou 3 repiquages (P3) suivis d'une différenciation. Le nombre de repiquage semble influencer la production virale puisque le taux d'ARN viral détecté est moins important après 3 repiquages qu'après un seul repiquage des cellules avant induction de la différenciation. L'analyse par sédimentation en gradient de saccharose des particules virales produites par ces cellules chroniquement infectées montre une population virale présentant une forte activité antigénique E1E2 et qui sédimentent à une densité entre 1,15 et 1,20 g/ml. Cette population virale peut être subdivisée en deux sous populations virales en fonction de la présence ou non d'ARN viral. Ainsi, la population virale qui sédimente à 1,14 - 1,15 g/ml présente la plus forte activité antigénique E1E2 associée à la majorité de l'apoB et de l'ApoE et ne contient pas d'ARN viral. Ces particules virales correspondent à des enveloppes vides. Par contre, la population virale avec une densité égale à 1,18 - 1,20 g/ml correspond aux particules virales complètes potentiellement infectieuses puisqu'elles contiennent la majorité de l'ARN viral associée à des protéines d'enveloppe E1E2 et aux apolipoprotéines B et E.

De plus, par microscopie électronique, nous avons montré que les cellules infectées de façon persistante présentent de nombreuses modifications morphologiques. En effet, les corps multivésiculaires ainsi que l'épaississement sous membranaire, les structures multilamellaires et les corps apoptotiques visualisés dans ces cellules infectées reflètent une réplication virale active des virus à ARN [Schwartz et al., 2004]. Ces observations sont spécifiques des cellules infectées puisque aucune modification morphologique n'a été observée dans des cellules non infectées utilisées comme contrôle négatif. Nous avons également montré dans ces cellules chroniquement infectées, une localisation

## DISCUSSION

cytosolique des antigènes d'enveloppe E1E2 du HCV au niveau membranaire, sous membranaire et souvent associés à des vésicules. Ces mêmes observations ont été obtenues en utilisant l'anticorps anti-capside (C7.50) pour la détection de l'antigène de capsid. L'ensemble de ces résultats suggèrent un bourgeonnement des virions *via* les exosomes [Masciopinto et al., 2004].

En plus de sa capacité inhibitrice *in vitro* des interactions entre les cellules d'hépatomes et les particules HCV sériques [Ndongo et al., 2009], nous avons montré que l'AcMo D32.10 est capable d'inhiber fortement jusqu'à 95 % à J14 et 80 % à J21 l'infection des cellules HepaRG par les particules HCVsp. Cet effet inhibiteur s'observe assez précocement suggérant une action de l'anticorps D32.10 dans les étapes d'attachement et d'entrée du virus.

### ***Expression de l'épitope D32.10 sur les particules HCV dérivées d'hépatocytes humains infectés in vivo et provenant de foie de patients cirrhotiques***

Dans la dernière partie de nos études *in vitro*, nous avons caractérisé les particules HCV secrétées par des hépatocytes de patients chroniquement infectés par le HCV (HCV-lp). Pour cela, nous avons d'abord étudié l'expression des protéines d'enveloppe à la surface des HCV-lp en utilisant l'anticorps monoclonal D32.10. Trois différentes préparations virales : VP1, VP2 (génotype 1b) et VP3 (génotype 2b) provenant de trois patients différents ont été analysés pour la réactivité antigénique E1E2/D32.10 en ELISA et en Western blot. Nos résultats révèlent que VP2 et VP3 présente une positivité en ELISA supérieure à 6,5 µg de protéine/ml, ce qui correspond à  $5 \times 10^3$  à  $5 \times 10^4$  copies d'ARN viral (limite de détection de la technique de bDNA). Ces résultats laissent penser que toutes les particules HCV, libérées par ces hépatocytes infectés et présentes dans ces préparations, contiennent de l'ARN viral et expriment l'épitope D32.10 à leur surface. De plus, la détection des formes monomériques (E1 et E2) et oligomériques E1E2 en conditions réductrices et non réductrices conforte cette affirmation. Une corrélation étroite a été observée entre la détection de l'ARN du HCV et l'activité antigénique E1E2/D32.10.

La forme monomérique de la protéine de capsid de 25 kDa ainsi que des formes multimériques (multiple de 25 kDa) ont été également identifiées dans les HCV-lp. Ces différentes bandes observées en western blot sont spécifiques de la capsid du HCV car

## DISCUSSION

aucun signal n'a été observé avec un contrôle négatif. Seule la VP2 exprime la forme monomérique de la protéine de capsid (25 kDa). Les VP1 et VP2 expriment des formes oligomériques à 50 kDa (VP3), 75 et 150 kDa (VP1). Ces derniers résultats sont similaires à ceux précédemment obtenus avec les particules HCV dérivées de sérum de patients infectés (HCVsp) en utilisant d'autres anticorps de révélation [Petit et al., 2005]. Ces observations confirment l'hétérogénéité moléculaire des protéines de capsid des particules HCV naturelles dérivées du sérum de patients ou d'hépatocytes infectés *in vivo*. Cette observation pourrait s'expliquer par la présence de séquences peptidiques clé pour initier la multimérisation spontanée du domaine C-terminal de la protéine de la capsid (125-179 aa) [Kim et al., 2006]. En effet, il a été montré que l'oligomérisation de la protéine de capsid était cruciale pour l'interaction avec le domaine cytoplasmique (288-346 aa) de la protéine d'enveloppe E1 [Nakai et al., 2006] lors de l'assemblage du HCV dans les hépatocytes humains normaux. Autre observation intéressante, la forme monomérique de la protéine de capsid lorsqu'elle est détectée dans les particules HCV dérivées de sérum ou du foie de patients cirrhotiques présente un poids moléculaire de 25 kDa au lieu de 21 kDa comme attendu. Bien qu'il ait longtemps été suggéré que le précurseur à 25 kDa subit un clivage protéolytique pour donner la forme mature à 21 kDa, nos observations concordent avec un modèle dans lequel la forme précurseur serait impliquée dans la morphogénèse des particules du HCV augmentant ainsi la stabilité de la capsid virale, proposé par Vauloup-Fellous et collaborateurs [Vauloup-Fellous et al., 2006].

Nous avons ainsi montré pour la première fois que les particules HCV secrétées à partir de cultures primaires d'hépatocytes humains infectés *in vivo* et provenant de foies de patients cirrhotiques qui contiennent de l'ARN viral et de la capsid expriment les protéines d'enveloppe E1E2 spécifiquement reconnues par l'anticorps monoclonal D32.10.

Ensuite, nous avons identifié puis caractérisé les sous populations virales présentes dans les différentes préparations VP1, VP2 et VP3. Pour cela, les trois VP (génotype 1 et 2) ont été soumises à une ultracentrifugation sur gradient de saccharose. Cette stratégie permet de séparer les particules en fonction de leur densité et une meilleure accessibilité aux protéines d'enveloppe du virus. Les résultats ont révélé la présence d'une population majoritaire qui exprime l'épitope E1E2/D32.10 détecté à la fois par les

## DISCUSSION

techniques d'ELISA et de western blot. Cette population sédimente à une densité comprise entre 1,15 et 1,25 g/ml. Ces résultats coïncident avec ceux déjà obtenus pour des virions libérés par les hépatocytes (densité de 1,16 à 1,20 g/ml), correspondant à la densité des autres flavivirus [Ito et al., 1996]. Plus récemment, l'analyse en gradient de saccharose de virions recombinants de la souche JFH-1 (génotype 2a) révèle la présence de protéine de capsid et d'ARN du HCV à la densité de 1,15 g/ml [Akazawa et al., 2008; Parent et al., 2009; Wakita et al., 2005]. Pour montrer que le signal observé est bien spécifique, nous avons analysé parallèlement une préparation provenant d'hépatocytes non infectés et montré qu'aucun signal E1E2 ou ARN du HCV était détecté tout au long du gradient. Ainsi, nous avons démontré que les particules HCV dérivés de foie de patients infectés (HCV-lp) présentent des propriétés physico-chimiques similaires aux virions recombinants (HCVcc) ainsi qu'aux particules provenant de sérum de patients (HCVsp) après sédimentation en gradient de saccharose [Petit et al., 2005].

Enfin, nous avons montré en immunohistochimie l'expression de l'épitope E1E2/D32.10 ainsi que celui de E2/D4.12.9 et de la capsid dans les hépatocytes humains infectés provenant de foies cirrhotiques. Une forte accumulation cytoplasmique de ces antigènes du HCV a été observée. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment avec des biopsies de foies cirrhotiques et tumoraux [Galy et al., 2007]. Ils montrent que les anticorps D32.10 et D4.12.9 reconnaissent des épitopes (E1)E2 conservés et constituent des outils originaux pour la détection des antigènes d'enveloppe du HCV indépendamment du génotype dans les hépatocytes infectés.

Au terme de cette étude nous avons montré que l'épitope conservé E1E2 reconnu par l'anticorps D32.10 est exprimé dans les hépatocytes infectés par le HCV et à la surface des particules dérivées de foie de patients infectés.

### **L'anticops monoclonal D32.10 présente des propriétés neutralisantes in vivo**

***Les anticorps anti-E1E2A,B « anti-E1E2 D32.10-peptide binding antibodies» sont associés à la guérison spontanée et prédictifs de la réponse aux traitements anti-HCV***

## DISCUSSION

Après avoir mis au point un test de détection des anticorps anti-E1E2A,B de même spécificité que l'AcMo D32.10, nous avons analysé la prévalence de ces anticorps dirigés contre l'épitope D32.10 dans le sérum de différents groupes de patients, puis déterminé leur signification clinique au cours de l'infection naturelle par le HCV. Nous avons démontré que la réponse humorale anti-E1E2A,B était présente sélectivement chez les patients qui guérissent spontanément de l'infection (> 85%) avec des titres très élevés > 1/1000 dans 80% des cas. En revanche, ces anticorps sont absents ou présents chez un très faible pourcentage (< 15%) de porteurs chroniques qui n'ont jamais été traités avec une probabilité <0,001. Pour vérifier que cette réponse anticorps est bien spécifique, nous avons analysé la réactivité de deux peptides irrelevantes (1X et 2X) présentant une homologie de séquence avec nos peptides d'intérêt E1, E2A et E2B comprise entre 7% et 20%. Aucune réactivité n'a été observée dans 80% à 90% des cas. La sensibilité du test a également été étudiée en évaluant différents formats du test, impliquant ou non le système streptavidine-biotine pour la capture de complexes peptide-anticorps. Quand les trois peptides biotinylés sont adsorbés ensemble sur une même phase solide, nous observons les mêmes résultats mais la positivité est plus faible tout en restant significative ( $0,001 < p < 0,01$ ). Cela probablement est dû à un encombrement stérique qui entraîne une moins bonne accessibilité des anticorps aux différentes régions qui constituent leur épitope. Ainsi, le test décrit et utilisé dans cette étude a été montré comme étant le meilleur format pour la détection des anticorps anti-E1E2A,B dans le sérum des patients infectés par le HCV.

Une étude transversale chez des patients non répondeurs (NR) et répondeurs complets (RC) avec une réponse virologique soutenue a permis de montrer que la prévalence des anticorps était de 40% chez les RC et seulement de 10% chez les NR avec une différence significative. Une étude longitudinale a ensuite été réalisée chez ces mêmes groupes de patients afin de déterminer le moment d'apparition de ces anticorps et leur cinétique. Nous avons démontré que les anticorps anti-E1E2A,B étaient présents avant même le début du traitement (M-1) avec un profil fluctuant et deux pics de détection à 1 mois et 3 mois après le début du traitement. Une diminution progressive des anticorps a été observée au cours du temps en restant positif un an après l'arrêt du traitement chez les répondeurs complets. En revanche, cette réponse anticorps est absente chez les patients non répondeurs tout au long du suivi. L'analyse des courbes ROC a permis de

## DISCUSSION

déterminer la VPP et la VPN aux différents temps qui sont respectivement de 100% et 87%, suggérant que ces anticorps peuvent prédire la réponse virologique soutenue aux traitements antiviraux.

Nos données suggèrent donc que les anticorps « *anti-E1E2A,B/D32.10-peptide binding* » ainsi que leur épitope E1-E2A-E2B jouent un rôle essentiel dans la clairance de l'infection naturelle par le HCV, contrairement aux anticorps AP33-*like* qui sont présents dans < 2,5% des patients quelque soit le stade de l'infection, guérie ou chronique [Tarr et al., 2007; Tarr et al., 2006]. Les anticorps neutralisants avec des épitopes conservés dans tous les isolats du HCV semblent être essentiels pour le développement d'un vaccin efficace capable d'induire une réponse immunitaire humorale protectrice. Jusqu'à présent, aucun paramètre n'a été montré capable de prédire avec précision la résolution spontanée de l'infection HCV [Santantonio et al., 2008]. Seule une réponse cellulaire efficace et multi-spécifique immunitaire est considérée comme un facteur important pour l'élimination spontanée du virus [Lucas et al., 2007]. Il a été mis en évidence qu'un taux faible d'IP-10 (*IFN  $\gamma$ -inducible protein-10* ou *CXC10*) pourrait être associé à une réponse virologique soutenue et prédictif de la réponse aux traitements antiviraux chez les patients infectés par le HCV de génotype 1 et 4 [Lagging et al., 2006]. Récemment, il a été démontré que des variations génétiques de l'IL28B, qui code pour l'IFN- $\lambda$  3 de type II seraient associés à la clairance de l'infection HCV et suggère un rôle important de IL-28B dans la résolution de l'infection [Thomas et al., 2009]. Il s'agit dans tous les cas de facteurs spécifiques de l'hôte. Concernant le virus, seul le taux de l'ARN du HCV avant traitement et la cinétique d'élimination précocement après le début du traitement est un facteur prédictif de réponse. Ainsi, la réponse humorale anti-E1E2A,B représente un nouveau marqueur viral capable de prédire une réponse virologique soutenue et peut donc s'avérer utile dans la prise de décision des cliniciens lors de la prise en charge des patients. Pour la première fois, nos résultats indiquent que l'induction de ces anticorps anti-E1E2A,B semble corrélérer avec l'élimination complète du HCV contrairement à ceux qui ont déjà été rapportés [Boo et al., 2007; Dreux et al., 2006; Lavillette et al., 2005a; Meunier et al., 2005; Pestka et al., 2007]. Plusieurs études ont montré que des anticorps dits neutralisants dirigés contre la région HVR1 de la protéine d'enveloppe E2 étaient présents dans le sérum de patients qui ont évolué aussi bien vers la guérison que vers la chronicité et n'étaient donc pas associés à la clairance virale [Pestka et al., 2007].

## DISCUSSION

Cette étude s'est avérée essentielle pour démontrer la pertinence clinique des anticorps anti-E1E2A,B chez les patients infectés par le HCV et que l'épitope E1 (297-306)-E2A (480-494)-E2B (613-621) était reconnu par des anticorps humains présents uniquement chez les patients qui ont résolu l'infection HCV spontanément ou sous traitement antiviral. Ceci suggère fortement que les anticorps anti-E1E2A,B sont neutralisants *in vivo*, prédictifs de l'élimination virale complète et peuvent constituer un nouveau marqueur pronostique de l'hépatite C.

## ***CONCLUSION & PERSPECTIVES***

---



## CONCLUSION & PERSPECTIVES

Par différentes approches développées au cours de cette thèse, nous avons pu montrer que l'anticorps monoclonal anti-E1E2/D32.10 présentait des propriétés neutralisantes *in vitro* et *in vivo*.

- 1) Nous avons mis en évidence l'implication de l'épitope E1E2 reconnu par l'anticorps monoclonal D32.10 dans les interactions de haute affinité via CD81 et les GAGs entre les particules HCV circulantes (HCVsp) et les cellules hépatocytaires humaines (Huh-7 et HepaRG). L'AcMo D32.10 est capable d'inhiber de façon spécifique et efficace (> 60%) les interactions de haute affinité avec une IC50 = 0,5 µg/ml [Ndongo et al., 2009].
- 2) Nous avons développé un système d'infection original *in vitro* qui implique d'une part les cellules HepaRG qui sont des cellules progénitrices du foie et présentent des propriétés fonctionnelles proches des hépatocytes humains et d'autre part des particules HCV provenant de sérum de patients chroniquement infectés par le HCV (HCVsp). Nous avons montré pour la première fois que les cellules HepaRG sont infectables par les HCVsp au stade prolifératif et capables de produire *de novo* de façon persistante des virions complets infectieux au stade différencié. Dans ce système, l'anticorps D32.10 est capable d'inhiber fortement l'infection. Cet effet inhibiteur s'exerce probablement au niveau des étapes précoces du cycle viral, d'attachement et d'entrée du virus dans la cellule.
- 3) Pour conforter l'importance de l'épitope E1E2 reconnu par l'AcMo D32.10, nous avons caractérisé les particules virales provenant de foie de patients chroniquement infectés *in vivo* par le HCV (HCV-1p) et montré que ces virions qui contiennent l'ARN viral et les protéines de capsid, expriment les protéines d'enveloppe E1E2 reconnues par l'AcMo D32.10. L'épitope E1E2/D32.10 a aussi été montré exprimé dans les hépatocytes humains provenant de biopsies de foies de patients HCV positifs.
- 4) Enfin, pour étudier le caractère neutralisant *in vivo* de l'anticorps monoclonal D32.10, nous avons cherché à déterminer la prévalence des anticorps de même spécificité que le D32.10 (anti-E1E2A,B) dans différents groupes de patients HCV positifs afin de préciser leur relevance clinique. En utilisant un test ELISA basé

## CONCLUSION & PERSPECTIVES

sur l'utilisation de peptides biotinylés E1, E2A et E2B correspond aux trois régions reconnues par l'anticorps, nous avons démontré que la réponse anticorps anti-E1E2A,B était présente dans 90% des cas chez les patients qui guérissent spontanément de l'infection et absente ou rare (< 10%) chez les patients porteurs chroniques non traités ou non répondeurs aux traitements antiviraux. Une étude longitudinale chez des patients non répondeurs ou répondeurs complets avec une réponse virologique soutenue à une bithérapie standard, interféron pégylé plus ribavirine associée à une analyse statistique des résultats, a permis de montrer que les anticorps anti-E1E2A,B étaient prédictifs de la réponse au traitement avec une spécificité et une valeur prédictive positive de 100%.

L'ensemble des résultats obtenus tout au long de ma thèse permettent d'envisager des applications dans le domaine du diagnostic HCV ainsi que d'une immunothérapie anti-HCV (**Figure 46**).

### ❖ En Diagnostic HCV :

- L'utilisation du test de détection des anticorps anti-E1E2A,B pour le suivi des patients HCV positifs sous thérapie antivirale constituera une aide précieuse aux cliniciens. Les résultats obtenus ici sont suffisamment concluants pour envisager un transfert de savoir faire auprès d'un industriel.
- La commercialisation des anticorps monoclonaux anti-E1E2/D32.10 et anti-E2/D4.12.9 pour la détection des antigènes d'enveloppe en anatomo-pathologie. En effet, ces anticorps sont capables de reconnaître chez les patients infectés par le HCV les protéines d'enveloppe dans des biopsies de foie cirrhotiques et/ou tumoraux [Galy et al., 2007].

### ❖ En Immunothérapie anti-HCV :

Les propriétés fonctionnelles intéressantes du D32.10 laissent suggérer à une utilisation en immunothérapie en particulier pour prévenir la réinfection du greffon chez les patients transplantés hépatiques pour cirrhose virale C. Actuellement les

## CONCLUSION & PERSPECTIVES

Immunoglobulines (IgG) anti-HCV humaines (NABI Biopharmaceuticals, Boca Raton, USA) et les anticorps monoclonaux humains (HCV-AB 65 et HCV-AB68, XTL Pharmaceuticals, Rehovot, Israel) en évaluation préclinique ont été validés sur le plan de la sécurité et sur le plan pharmacocinétique mais présentent des effets bénéfiques très insuffisants (diminution de la virémie mais pas de négativation), d'où la nécessité d'identifier des anticorps capables de neutraliser efficacement l'infection *in vivo*. Pour cela, la preuve de concept *in vivo* dans un modèle animal semble être essentielle. Le chimpanzé constitue le modèle idéal mais présente quelques limitations qui rendent son utilisation difficile. Récemment, un nouveau modèle de souris uPA-SCID humanisées (voir chapitre I, modèles animaux) a été développé par l'équipe de Geert Leroux-Roels et montré qu'ils étaient permissifs à l'infection par le HCV [Meuleman et al., 2005]. Le développement du modèle de souris chimériques représente une avancée majeure en comparaison avec les cultures *in vitro* d'hépatocytes humains. Il a été montré qu'une forte infection HCV pouvait s'établir chez ces souris transgéniques uPA-SCID greffées avec des hépatocytes humains [Kaul et al., 2007; Meuleman and Leroux-Roels, 2008]. Ainsi, l'effet protecteur de l'anticorps D32.10 pourrait être testé dans ce modèle qui a déjà été utilisé pour évaluer des anticorps monoclonaux humains anti-E2/AR3 [Law et al., 2008]. Ces anticorps reconnaissent des épitopes discontinus formés par trois régions de la protéine E2 (396-424, 436-447 et 523-540) qui sont distincts de ceux reconnus par le D32.10. Si une protection complète ou partielle est observée avec l'anticorps D32.10, une induction des anticorps anti-E1E2A,B par la vaccination ou une immunothérapie basée sur l'utilisation du D32.10 pourrait avoir un effet protecteur.

L'utilisation de l'anticorps monoclonal de souris D32.10 en thérapeutique chez l'homme nécessite une humanisation. Le but de l'humanisation d'un anticorps est de produire des régions variables proches des régions humaines sans que l'anticorps humanisé perde l'affinité et la spécificité de l'anticorps murin. Ainsi, les régions hypervariables (ou région déterminant la complémentarité avec l'antigène, CDR) d'un anticorps humain sont remplacées par des régions CDR d'origine murine, qui constituent le site de liaison de l'antigène. Cependant, certains acides aminés situés dans les régions adjacentes aux régions CDR (régions charpentes, ou FR pour *Framework*) peuvent jouer un rôle majeur dans la structure du site de liaison de l'antigène. Pour conserver cette structure au cours de l'humanisation, l'anticorps accepteur est greffé non seulement

## CONCLUSION & PERSPECTIVES

avec les régions CDR de l'anticorps murin donneur, mais aussi les acides aminés de la région charpente de l'anticorps donneur. Une immunothérapie utilisant l'anticorps D32.10 pourrait être envisagée pour prévenir la réinfection après transplantation hépatique chez les patients chroniquement infectés.

A plus long terme, le D32.10 pourrait être utilisé pour l'élaboration d'un vaccin peptidique contre l'hépatite C basé sur l'épitope E1E2/D32.10 exprimé à la surface d'un vecteur adéquate d'expression, comme le Flock house virus [Xiong et al., 2005], sous forme conformationnelle.

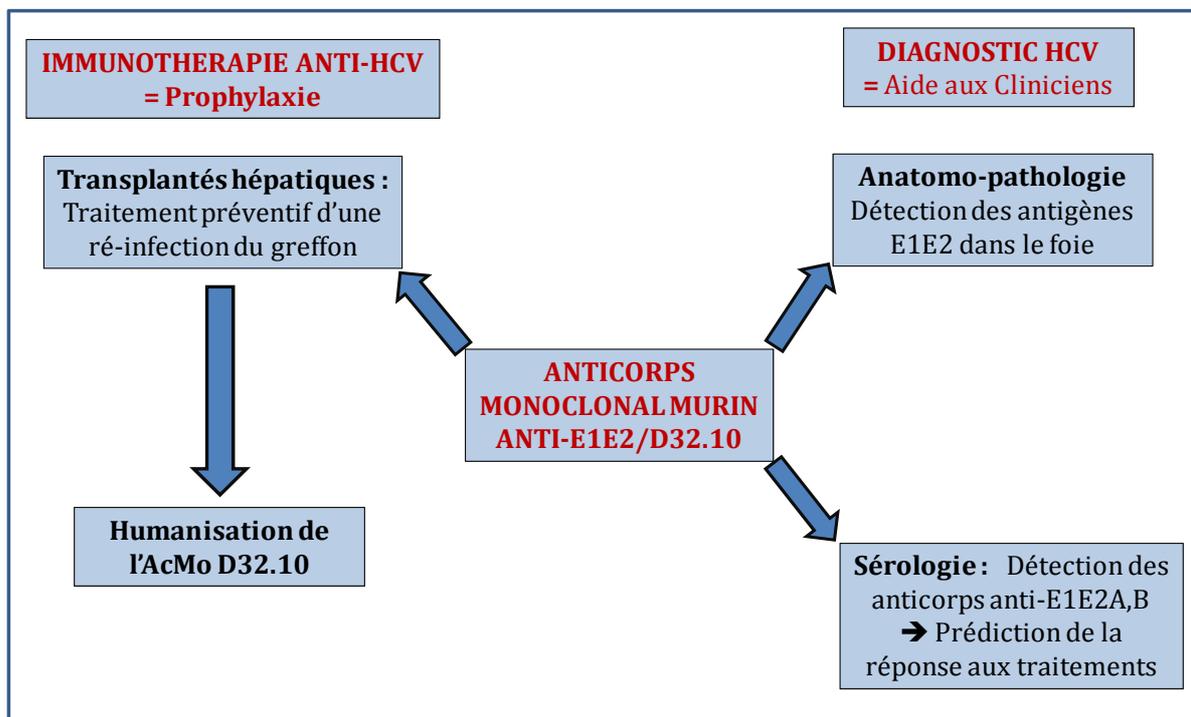


Figure 46 : Applications thérapeutiques de l'AcMo D32.10

## ***REFERENCES***

---



## REFERENCES

1999. Proceedings of the European Association for the Study of the Liver International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, France, 26-27 February 1999. *J Hepatol* 31 Suppl 1:1-268.
- Abe K, Kurata T, Teramoto Y, Shiga J, Shikata T. 1993. Lack of susceptibility of various primates and woodchucks to hepatitis C virus. *J Med Primatol* 22(7-8):433-434.
- Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. 1999. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22):12766-12771.
- Ahlenstiel G, Titerence RH, Koh C, Edlich B, Feld JJ, Rotman Y, Ghany MG, Hoofnagle JH, Liang TJ, Heller T, Rehermann B. 2009. Natural Killer Cells Are Polarized Toward Cytotoxicity in Chronic Hepatitis C in an Interferon-Alpha-Dependent Manner. *Gastroenterology*.
- Ait-Goughoulte M, Kanda T, Meyer K, Ryerse JS, Ray RB, Ray R. 2008. Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J Virol* 82(5):2241-2249.
- Aizaki H, Suzuki T. 2004. [Mechanism of HCV-RNA replication]. *Nippon Rinsho* 62 Suppl 7(Pt 1):81-84.
- Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. 2008. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 377(3):747-751.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413(6857):732-738.
- Ali N, Pruijn GJ, Kenan DJ, Keene JD, Siddiqui A. 2000. Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 275(36):27531-27540.
- Ali N, Siddiqui A. 1995. Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J Virol* 69(10):6367-6375.
- Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. 1978. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1(8062):459-463.
- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. 1989. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 321(22):1494-1500.
- Alter HJ, Seeff LB. 2000. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 20(1):17-35.
- Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, Pol S, Brechot C, Paranhos-Baccala G, Lotteau V. 2002. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76(14):6919-6928.
- Andre P, Perlemuter G, Budkowska A, Brechot C, Lotteau V. 2005. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis* 25(1):93-104.
- Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouet S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. 2006. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 34(1):75-83.
- Arteaga-Vizcaino M, Blitz-Dorfman L, Echeverria JM, Leon P, Weir-Medina J, Diez-Ewald M, Vizcaino G, Torres E, Porto-Espinoza L. 1993. [Hepatitis C in hemophiliac patients in Maracaibo, Venezuela]. *Invest Clin* 34(3):113-118.
- Asselah T, Boudjema H, Francoz C, Sobesky R, Valla D, Belghiti J, Marcellin P, Durand F. 2006a. [Hepatitis C and liver transplantation: fibrosis progression and treatment. Or how to improve management]. *Gastroenterol Clin Biol* 30(11):1281-1295.
- Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. 2006b. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut* 55(1):123-130.
- Bain C, Parroche P, Lavergne JP, Duverger B, Vieux C, Dubois V, Komurian-Pradel F, Trepo C, Gebuhrer L, Paranhos-Baccala G, Penin F, Inchauspe G. 2004. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol* 78(19):10460-10469.

## REFERENCES

- Ballet F, Barbare JC, Poupon R. 1984. Hepatic extraction of adriamycin in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20(6):761-764.
- Banerjee R, Dasgupta A. 2001. Specific interaction of hepatitis C virus protease/helicase NS3 with the 3'-terminal sequences of viral positive- and negative-strand RNA. *J Virol* 75(4):1708-1721.
- Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, 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(4):1200-1205.
- Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol* 68(8):5045-5055.
- Barth H, Cerino R, Arcuri M, Hoffmann M, Schurmann P, Adah MI, Gissler B, Zhao X, Ghisetti V, Lavezzo B, Blum HE, von Weizsacker F, Vitelli A, Scarselli E, Baumert TF. 2005a. Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. *J Virol* 79(9):5774-5785.
- Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, Von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF. 2003. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278(42):41003-41012.
- Barth H, Schnober EK, Zhang F, Linhardt RJ, Depla E, Boson B, Cosset FL, Patel AH, Blum HE, Baumert TF. 2006. Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* 80(21):10579-10590.
- Barth H, Ulsenheimer A, Pape GR, Diepolder HM, Hoffmann M, Neumann-Haefelin C, Thimme R, Henneke P, Klein R, Paranhos-Baccala G, Depla E, Liang TJ, Blum HE, Baumert TF. 2005b. Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood* 105(9):3605-3614.
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. 2003a. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197(5):633-642.
- Bartosch B, Verney G, Dreux M, Donot P, Morice Y, Penin F, Pawlotsky JM, Lavillette D, Cosset FL. 2005. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* 79(13):8217-8229.
- Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. 2003b. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 278(43):41624-41630.
- Bassett SE, Brasky KM, Lanford RE. 1998. Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *J Virol* 72(4):2589-2599.
- Bassett SE, Guerra B, Brasky K, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel GR, Lanford RE. 2001. Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Hepatology* 33(6):1479-1487.
- Bassett SE, Thomas DL, Brasky KM, Lanford RE. 1999. Viral persistence, antibody to E1 and E2, and hypervariable region 1 sequence stability in hepatitis C virus-inoculated chimpanzees. *J Virol* 73(2):1118-1126.
- Basu A, Kanda T, Beyene A, Saito K, Meyer K, Ray R. 2007. Sulfated homologues of heparin inhibit hepatitis C virus entry into mammalian cells. *J Virol* 81(8):3933-3941.
- Basu A, Steele R, Ray R, Ray RB. 2004. Functional properties of a 16 kDa protein translated from an alternative open reading frame of the core-encoding genomic region of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 85(Pt 8):2299-2306.
- Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. 2004. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 126(2):529-540.

## REFERENCES

- Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ. 1998. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 72(5):3827-3836.
- Baumert TF, Vergalla J, Satoi J, Thomson M, Lechmann M, Herion D, Greenberg HB, Ito S, Liang TJ. 1999. Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology* 117(6):1397-1407.
- Beach MJ, Meeks EL, Mimms LT, Vallari D, DuCharme L, Spelbring J, Taskar S, Schleicher JB, Krawczynski K, Bradley DW. 1992. Temporal relationships of hepatitis C virus RNA and antibody responses following experimental infection of chimpanzees. *J Med Virol* 36(3):226-237.
- Benani A, El-Turk J, Benjelloun S, Sekkat S, Nadifi S, Hda N, Benslimane A. 1997. HCV genotypes in Morocco. *J Med Virol* 52(4):396-398.
- Benedicto I, Molina-Jimenez F, Barreiro O, Maldonado-Rodriguez A, Prieto J, Moreno-Otero R, Aldabe R, Lopez-Cabrera M, Majano PL. 2008. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* 48(4):1044-1053.
- Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouille Y. 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80(14):6964-6972.
- Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290(5498):1972-1974.
- Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM. 2003. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* 77(5):3181-3190.
- Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76(24):13001-13014.
- Blight KJ, Rice CM. 1997. Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 71(10):7345-7352.
- Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, Oesch F, Zabel B. 2002. Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* 11(3):115-132.
- Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Erhardt A, Schaper F, Heinrich PC, Haussinger D. 2003. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* 17(3):488-490.
- Boehringer D, Thermann R, Ostareck-Lederer A, Lewis JD, Stark H. 2005. Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES. *Structure* 13(11):1695-1706.
- Boo I, Fischer AE, Johnson D, Chin R, Giourouki M, Bharadwaj M, Bowden S, Torresi J, Drummer H. 2007. Neutralizing antibodies in patients with chronic hepatitis C infection treated with (Peg)-interferon/ribavirin. *J Clin Virol* 39(4):288-294.
- Borowski P, Schalinski S, Schmitz H. 2002. Nucleotide triphosphatase/helicase of hepatitis C virus as a target for antiviral therapy. *Antiviral Res* 55(3):397-412.
- Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratniner M, Targett-Adams P, Lavergne JP, Penin F, McLauchlan J. 2006. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 281(31):22236-22247.
- Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP. 2005. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* 79(17):11353-11365.
- Bradley D, McCaustland K, Krawczynski K, Spelbring J, Humphrey C, Cook EH. 1991. Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J Med Virol* 34(3):206-208.
- Bradley DW. 1985. The agents of non-A, non-B viral hepatitis. *J Virol Methods* 10(4):307-319.
- Bradley DW, Maynard JE, Popper H, Cook EH, Ebert JW, McCaustland KA, Schable CA, Fields HA. 1983. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. *J Infect Dis* 148(2):254-265.

## REFERENCES

- Broering TJ, Garrity KA, Boatright NK, Sloan SE, Sandor F, Thomas WD, Jr., Szabo G, Finberg RW, Ambrosino DM, Babcock GJ. 2009. Identification and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies directed against the E2 envelope glycoprotein of hepatitis C virus. *J Virol* 83(23):12473-12482.
- Buck M. 2008. Direct infection and replication of naturally occurring hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3 and 4 in normal human hepatocyte cultures. *PLoS One* 3(7):e2660.
- Budhu A, Chen Y, Kim JW, Forgues M, Valerie K, Harris CC, Wang XW. 2007. Induction of a unique gene expression profile in primary human hepatocytes by hepatitis C virus core, NS3 and NS5A proteins. *Carcinogenesis* 28(7):1552-1560.
- Bukh J. 2004. A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* 39(6):1469-1475.
- Bukh J, Apgar CL, Engle R, Govindarajan S, Hegerich PA, Tellier R, Wong DC, Elkins R, Kew MC. 1998. Experimental infection of chimpanzees with hepatitis C virus of genotype 5a: genetic analysis of the virus and generation of a standardized challenge pool. *J Infect Dis* 178(4):1193-1197.
- Bukh J, Purcell RH. 2006. A milestone for hepatitis C virus research: a virus generated in cell culture is fully viable in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10):3500-3501.
- Buonocore L, Blight KJ, Rice CM, Rose JK. 2002. Characterization of vesicular stomatitis virus recombinants that express and incorporate high levels of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol* 76(14):6865-6872.
- Burckstummer T, Kriegs M, Lupberger J, Pauli EK, Schmitt S, Hildt E. 2006. Raf-1 kinase associates with Hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *FEBS Lett* 580(2):575-580.
- Buttin G, LeGuern G, Phalente L, Lin EC, Medrano L, Cazenave PA. 1978. Production of hybrid lines secreting monoclonal anti-idiotypic antibodies by cell fusion on membrane filters. *Curr Top Microbiol Immunol* 81:27-36.
- Callens N, Ciczora Y, Bartosch B, Vu-Dac N, Cosset FL, Pawlotsky JM, Penin F, Dubuisson J. 2005. Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol* 79(24):15331-15341.
- Carloni G, Iacovacci S, Sargiacomo M, Ravagnan G, Ponzetto A, Peschle C, Battaglia M. 1993. Susceptibility of human liver cell cultures to hepatitis C virus infection. *Arch Virol Suppl* 8:31-39.
- Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J. 2002. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 76(8):3720-3730.
- Carriere M, Pene V, Breiman A, Conti F, Chouzenoux S, Meurs E, Andrieu M, Jaffray P, Grira L, Soubrane O, Sogni P, Calmus Y, Chaussade S, Rosenberg AR, Podevin P. 2007. A novel, sensitive, and specific RT-PCR technique for quantitation of hepatitis C virus replication. *J Med Virol* 79(2):155-160.
- Castet V, Fournier C, Soulier A, Brillet R, Coste J, Larrey D, Dhumeaux D, Maurel P, Pawlotsky JM. 2002. Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virol* 76(16):8189-8199.
- Cereijido M, Valdes J, Shoshani L, Contreras RG. 1998. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol* 60:161-177.
- Chamberlain RW, Adams NJ, Taylor LA, Simmonds P, Elliott RM. 1997. The complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 5a, the predominant genotype in South Africa. *Biochem Biophys Res Commun* 236(1):44-49.
- Chang KO. 2009. Role of cholesterol pathways in norovirus replication. *J Virol* 83(17):8587-8595.
- Cheung RC. 2000. Epidemiology of hepatitis C virus infection in American veterans. *Am J Gastroenterol* 95(3):740-747.
- Choi SH, Kim SY, Park KJ, Kim YJ, Hwang SB. 2004. Hepatitis C virus core protein is efficiently released into the culture medium in insect cells. *J Biochem Mol Biol* 37(6):735-740.

## REFERENCES

- Chong TW, Smith RL, Hughes MG, Camden J, Rudy CK, Evans HL, Sawyer RG, Pruett TL. 2006. Primary human hepatocytes in spheroid formation to study hepatitis C infection. *J Surg Res* 130(1):52-57.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244(4902):359-362.
- Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, et al. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(6):2451-2455.
- Choo SH, So HS, Cho JM, Ryu WS. 1995. Association of hepatitis C virus particles with immunoglobulin: a mechanism for persistent infection. *J Gen Virol* 76 ( Pt 9):2337-2341.
- Chung KM, Lee J, Kim JE, Song OK, Cho S, Lim J, Seedorf M, Hahm B, Jang SK. 2000. Nonstructural protein 5A of hepatitis C virus inhibits the function of karyopherin beta3. *J Virol* 74(11):5233-5241.
- Clarke D, Griffin S, Beales L, Gelais CS, Burgess S, Harris M, Rowlands D. 2006. Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro. *J Biol Chem* 281(48):37057-37068.
- Clayton RF, Owsianka A, Aitken J, Graham S, Bhella D, Patel AH. 2002. Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. *J Virol* 76(15):7672-7682.
- Cocquerel L, Meunier JC, Op de Beeck A, Bonte D, Wychowski C, Dubuisson J. 2001. Coexpression of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 in cis improves the stability of membrane insertion of E2. *J Gen Virol* 82(Pt 7):1629-1635.
- 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(3):2183-2191.
- Cocquerel L, Op de Beeck A, Lambot M, Roussel J, Delgrange D, Pillez A, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J. 2002. Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J* 21(12):2893-2902.
- Cocquerel L, Wychowski C, Minner F, Penin F, Dubuisson J. 2000. Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J Virol* 74(8):3623-3633.
- Codran A, Royer C, Jaeck D, Bastien-Valle M, Baumert TF, Kieny MP, Pereira CA, Martin JP. 2006. Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Gen Virol* 87(Pt 9):2583-2593.
- Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. 1999. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10(4):439-449.
- Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic T. 2004. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19):7270-7274.
- Cribier B, Schmitt C, Bingen A, Kirn A, Keller F. 1995. In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J Gen Virol* 76 ( Pt 10):2485-2491.
- Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM. 2002. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 195(1):35-41.
- D'Atri F, Nadalutti F, Citi S. 2002. Evidence for a functional interaction between cingulin and ZO-1 in cultured cells. *J Biol Chem* 277(31):27757-27764.
- Date T, Kato T, Miyamoto M, Zhao Z, Yasui K, Mizokami M, Wakita T. 2004. Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem* 279(21):22371-22376.
- De Francesco R, Urbani A, Nardi MC, Tomei L, Steinkuhler C, Tramontano A. 1996. A zinc binding site in viral serine proteinases. *Biochemistry* 35(41):13282-13287.

## REFERENCES

- Decaens T, Hurtova M, Duvoux C. 2009. [Liver transplantation for hepatocellular carcinoma]. *Gastroenterol Clin Biol* 33(1 Pt 1):61-69.
- Deforges S, Evtashev A, Perret M, Sodayer M, Pouzol S, Scoazec JY, Bonnaud B, Diaz O, Paranhos-Baccala G, Lotteau V, Andre P. 2004. Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J Gen Virol* 85(Pt 9):2515-2523.
- Delhem N, Sabile A, Gajardo R, Podevin P, Abadie A, Blaton MA, Kremsdorf D, Beretta L, Brechot C. 2001. Activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by hepatocellular carcinoma derived-hepatitis C virus core protein. *Oncogene* 20(41):5836-5845.
- Della Bella S, Crosignani A, Riva A, Presicce P, Benetti A, Longhi R, Podda M, Villa ML. 2007. Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus-specific CD4+ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection. *Immunology* 121(2):283-292.
- Diaz O, Delers F, Maynard M, Demignot S, Zoulim F, Chambaz J, Trepo C, Lotteau V, Andre P. 2006. Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *J Gen Virol* 87(Pt 10):2983-2991.
- Dolganiuc A, Paek E, Kodys K, Thomas J, Szabo G. 2008. Myeloid dendritic cells of patients with chronic HCV infection induce proliferation of regulatory T lymphocytes. *Gastroenterology* 135(6):2119-2127.
- Donahue JG, Munoz A, Ness PM, Brown DE, Jr., Yawn DH, McAllister HA, Jr., Reitz BA, Nelson KE. 1992. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 327(6):369-373.
- Dreux M, Pietschmann T, Granier C, Voisset C, Ricard-Blum S, Mangeot PE, Keck Z, Fong S, Vudac N, Dubuisson J, Bartenschlager R, Lavillette D, Cosset FL. 2006. High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem* 281(27):18285-18295.
- Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 68(10):6147-6160.
- Dubuisson J, Penin F, Moradpour D. 2002. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol* 12(11):517-523.
- Dubuisson J, Rice CM. 1996. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J Virol* 70(2):778-786.
- Dumoulin FL, von dem Bussche A, Li J, Khamzina L, Wands JR, Sauerbruch T, Spengler U. 2003. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology* 305(2):260-266.
- Dusheiko G, Simmonds P. 1994. Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. *J Viral Hepat* 1(1):3-15.
- Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76(12):5974-5984.
- Elazar M, Liu P, Rice CM, Glenn JS. 2004. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol* 78(20):11393-11400.
- Erdtmann L, Franck N, Lerat H, Le Seyec J, Gilot D, Cannie I, Gripon P, Hibner U, Guguen-Guillouzo C. 2003. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278(20):18256-18264.
- Evans MJ, von Hahn T, Tschernie DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446(7137):801-805.
- Falcon V, Acosta-Rivero N, Chinea G, de la Rosa MC, Menendez I, Duenas-Carrera S, Gra B, Rodriguez A, Tsutsumi V, Shibayama M, Luna-Munoz J, Miranda-Sanchez MM, Morales-Grillo J, Kouri J. 2003. Nuclear localization of nucleocapsid-like particles and HCV core protein in hepatocytes of a chronically HCV-infected patient. *Biochem Biophys Res Commun* 310(1):54-58.

## REFERENCES

- Fan Z, Yang QR, Twu JS, Sherker AH. 1999. Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein. *J Med Virol* 59(2):131-134.
- Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B, Purcell RH. 1991. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 325(2):98-104.
- Farci P, Bukh J, Purcell RH. 1997. The quasispecies of hepatitis C virus and the host immune response. *Springer Semin Immunopathol* 19(1):5-26.
- Farci P, London WT, Wong DC, Dawson GJ, Vallari DS, Engle R, Purcell RH. 1992. The natural history of infection with hepatitis C virus (HCV) in chimpanzees: comparison of serologic responses measured with first- and second-generation assays and relationship to HCV viremia. *J Infect Dis* 165(6):1006-1011.
- Farci P, Orgiana G, Purcell RH. 1995. Immunity elicited by hepatitis C virus. *Clin Exp Rheumatol* 13 Suppl 13:S9-12.
- Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzeria A, Shimizu Y, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. 1996. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26):15394-15399.
- Fearon DT, Carter RH. 1995. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol* 13:127-149.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. 2001. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. 1975. *Rev Med Virol* 11(1):3-8; discussion 8-9.
- Fiorucci M, Boulant S, Fournillier A, Abraham JD, Lavergne JP, Paranhos-Baccala G, Inchauspe G, Bain C. 2007. Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *J Gen Virol* 88(Pt 4):1149-1162.
- Flint M, Thomas JM, Maidens CM, Shotton C, Levy S, Barclay WS, McKeating JA. 1999. Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 73(8):6782-6790.
- Flint M, von Hahn T, Zhang J, Farquhar M, Jones CT, Balfe P, Rice CM, McKeating JA. 2006. Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J Virol* 80(22):11331-11342.
- Forns X, Thimme R, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Chisari FV, 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(24):13318-13323.
- Fournier C, Sureau C, Coste J, Ducos J, Pageaux G, Larrey D, Domergue J, 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.
- Fournillier Jacob A, Cahour A, Escriou N, Girad M, Wychowski C. 1996. Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. *J Gen Virol* 77 ( Pt 5):1055-1064.
- Foy E, Li K, Sumpter R, Jr., Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M, Jr. 2005. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8):2986-2991.
- Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Jr., Ikeda M, Lemon SM, Gale M, Jr. 2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300(5622):1145-1148.
- Francavilla V, Accapezzato D, De Salvo M, Rawson P, Cosimi O, Lipp M, Cerino A, Cividini A, Mondelli MU, Barnaba V. 2004. Subversion of effector CD8+ T cell differentiation in acute hepatitis C virus infection: exploring the immunological mechanisms. *Eur J Immunol* 34(2):427-437.
- Franck N, Le Seyec J, Guguen-Guillouzo C, 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(5):2700-2708.

## REFERENCES

- Fredericksen B, Akkaraju GR, Foy E, Wang C, Pflugheber J, Chen ZJ, Gale M, Jr. 2002. Activation of the interferon-beta promoter during hepatitis C virus RNA replication. *Viral Immunol* 15(1):29-40.
- Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75(24):12047-12057.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347(13):975-982.
- Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, 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(7):1539-1550.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123(6 Pt 2):1777-1788.
- Gale M, Jr., Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 18(9):5208-5218.
- Gale M, Jr., Foy EM. 2005. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 436(7053):939-945.
- Gale MJ, Jr., Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. 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(2):217-227.
- Galun E, Burakova T, Ketzinel M, Lubin I, Shezen E, Kahana Y, Eid A, Ilan Y, Rivkind A, Pizov G, et al. 1995. Hepatitis C virus viremia in SCID-->BNX mouse chimera. *J Infect Dis* 172(1):25-30.
- Galy O, Petit MA, Benjelloun S, Chevallier P, Chevallier M, Srivatanakul P, Karalak A, Carreira C, Lyandrat N, Essaid A, Trepo C, Hainaut P, Chemin I. 2007. Efficient hepatitis C antigen immunohistological staining in sections of normal, cirrhotic and tumoral liver using a new monoclonal antibody directed against serum-derived HCV E2 glycoproteins. *Cancer Lett* 248(1):81-88.
- Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM. 2004. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 78(7):3480-3488.
- Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. 2003. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8):4498-4503.
- Garry RF, 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(2):255-265.
- Garson JA, Whitby K, Watkins P, Morgan AJ. 1997. Lack of susceptibility of the cottontop tamarin to hepatitis C infection. *J Med Virol* 52(3):286-288.
- Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, Zarski JP, Drouet E. 2002. Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol* 68(2):206-215.
- Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB. 2000. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 275(10):7184-7188.
- Glue P, Fang JW, Rouzier-Panis R, Raffanel C, Sabo R, Gupta SK, Salfi M, Jacobs S. 2000. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin Pharmacol Ther* 68(5):556-567.
- Godard A, Heymann D, Raheer S, Anegon I, Peyrat MA, Le Mauff B, Mouray E, Gregoire M, Virdee K, Soullillou JP, et al. 1992. High and low affinity receptors for human interleukin for DA

## REFERENCES

- cells/leukemia inhibitory factor on human cells. Molecular characterization and cellular distribution. *J Biol Chem* 267(5):3214-3222.
- Goffard A, Dubuisson J. 2003. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie* 85(3-4):295-301.
- Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Tan YH, Lim SG, Fuller-Pace F, Hong W. 2004. Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J Virol* 78(10):5288-5298.
- Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D. 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77(9):5487-5492.
- Gottwein JM, Scheel TK, Hoegh AM, Lademann JB, Eugen-Olsen J, Lisby G, Bukh J. 2007. Robust hepatitis C genotype 3a cell culture releasing adapted intergenotypic 3a/2a (S52/JFH1) viruses. *Gastroenterology* 133(5):1614-1626.
- Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. 1993a. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22):10583-10587.
- Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. 1993b. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67(3):1385-1395.
- Gretton SN, Taylor AI, McLauchlan J. 2005. Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol* 86(Pt 5):1415-1421.
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15655-15660.
- Gruner NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, Hoffmann R, Zachoval R, Santantonio T, Cucchiaroni M, Cerny A, Pape GR. 2000. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 181(5):1528-1536.
- Guguen-Guillouzo C, Bourel M, Guillouzo A. 1986. Human hepatocyte cultures. *Prog Liver Dis* 8:33-50.
- Guillouzo A. 1998. Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 2:511-532.
- Guo JT, Bichko VV, Seeger C. 2001. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 75(18):8516-8523.
- Haberstroh A, Schnober EK, Zeisel MB, Carolla P, Barth H, Blum HE, Cosset FL, Koutsoudakis G, Bartenschlager R, Union A, Depla E, Owsianka A, Patel AH, Schuster C, Stoll-Keller F, Doffoel M, Dreux M, Baumert TF. 2008. Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* 135(5):1719-1728 e1711.
- Hahm B, Kim YK, Kim JH, Kim TY, Jang SK. 1998. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 72(11):8782-8788.
- Hakamada T, Funatsuki K, Morita H, Ugajin T, Nakamura I, Ishiko H, Matsuzaki Y, Tanaka N, Imawari M. 2004. Identification of novel hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte epitopes by ELISpot assay using peptides with human leukocyte antigen-A\*2402-binding motifs. *J Gen Virol* 85(Pt 6):1521-1531.
- Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y. 2005. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 79(21):13473-13482.
- He Y, Yan W, Coito C, Li Y, Gale M, Jr., Katze MG. 2003. The regulation of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome-entry site-mediated translation by HCV replicons and nonstructural proteins. *J Gen Virol* 84(Pt 3):535-543.
- Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. 1990. Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. *Cell* 62(3):447-456.

## REFERENCES

- Henrard DR, Berthillon P, Scheffel JW, Ladaïque PL, Moore BS, Pailhous MC, Finetti PH, Trepo C. 1998. Lack of evidence of hepatitis C infection in 290 blood component recipients, demonstrated by several single-antigen research immunoassays. *Transfusion* 38(2):194-198.
- Herzer K, Falk CS, Encke J, Eichhorst ST, Ulsenheimer A, Seliger B, Krammer PH. 2003. Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. *J Virol* 77(15):8299-8309.
- Hewitt NJ, Lecluyse EL, Ferguson SS. 2007. Induction of hepatic cytochrome P450 enzymes: methods, mechanisms, recommendations, and in vitro-in vivo correlations. *Xenobiotica* 37(10-11):1196-1224.
- Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K. 1991. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(13):5547-5551.
- Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. 1993. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 67(8):4665-4675.
- Hino K. 1994. Diagnosis of hepatitis C. *Intervirol* 37(2):77-86.
- Hirano M, Kaneko S, Yamashita T, Luo H, Qin W, Shiota Y, Nomura T, Kobayashi K, Murakami S. 2003. Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *J Biol Chem* 278(7):5109-5115.
- Hiroishi K, Ito T, Imawari M. 2008. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. *J Gastroenterol Hepatol* 23(10):1473-1482.
- Honda M, Kaneko S, Matsushita E, Kobayashi K, Abell GA, Lemon SM. 2000. Cell cycle regulation of hepatitis C virus internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology* 118(1):152-162.
- Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12):7271-7276.
- Huang H, Chen Y, Ye J. 2007. Inhibition of hepatitis C virus replication by peroxidation of arachidonate and restoration by vitamin E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(47):18666-18670.
- Hugle T, Fehrmann F, Bieck E, Kohara M, Krausslich HG, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. 2001. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284(1):70-81.
- Iacovacci S, Manzin A, Barca S, Sargiacomo M, Serafino A, Valli MB, Macioce G, Hassan HJ, Ponzetto A, Clementi M, Peschle C, Carloni G. 1997. Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. *Hepatology* 26(5):1328-1337.
- Icard V, Diaz O, Scholtes C, Perrin-Cocon L, Ramiere C, Bartenschlager R, Penin F, Lotteau V, Andre P. 2009. Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS One* 4(1):e4233.
- Ikeda M, Sugiyama K, Mizutani T, Tanaka T, Tanaka K, Sekihara H, Shimotohno K, Kato N. 1998. Human hepatocyte clonal cell lines that support persistent replication of hepatitis C virus. *Virus Res* 56(2):157-167.
- 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, Dagan S. 2002. The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV. *J Infect Dis* 185(2):153-161.
- Imbert I, Dimitrova M, Kien F, Kieny MP, Schuster C. 2003. Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins. *J Gen Virol* 84(Pt 6):1549-1557.
- Ishido S, Fujita T, Hotta H. 1998. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 244(1):35-40.

## REFERENCES

- Isoyama T, Kamoshita N, Yasui K, Iwai A, Shiroki K, Toyoda H, Yamada A, Takasaki Y, Nomoto A. 1999. Lower concentration of La protein required for internal ribosome entry on hepatitis C virus RNA than on poliovirus RNA. *J Gen Virol* 80 ( Pt 9):2319-2327.
- Ito T, Mukaigawa J, Zuo J, Hirabayashi Y, Mitamura K, 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.
- Ivanyi-Nagy R, Kanevsky I, Gabus C, Lavergne JP, Ficheux D, Penin F, Fosse P, Darlix JL. 2006. Analysis of hepatitis C virus RNA dimerization and core-RNA interactions. *Nucleic Acids Res* 34(9):2618-2633.
- Jeannel D, Fretz C, Traore Y, Kohdjo N, Bigot A, Pe Gamy E, Jourdan G, Kourouma K, Maertens G, Fumoux F, Fournel JJ, Stuyver L. 1998. Evidence for high genetic diversity and long-term endemicity of hepatitis C virus genotypes 1 and 2 in West Africa. *J Med Virol* 55(2):92-97.
- Ji H, Fraser CS, Yu Y, Leary J, Doudna JA. 2004. Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49):16990-16995.
- Kaisho T, Akira S. 2000. Critical roles of Toll-like receptors in host defense. *Crit Rev Immunol* 20(5):393-405.
- Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M. 1994. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 75 ( Pt 7):1755-1760.
- Kanda T, Basu A, Steele R, Wakita T, Ryerse JS, Ray R, Ray RB. 2006. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. *J Virol* 80(9):4633-4639.
- Kanda T, Steele R, Ray R, Ray RB. 2007. Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *J Virol* 81(2):669-676.
- Kanebratt KP, Andersson TB. 2008. HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. *Drug Metab Dispos* 36(1):137-145.
- Kaneko T, Nakamura I, Kita H, Hiroishi K, Moriyama T, Imawari M. 1996. Three new cytotoxic T cell epitopes identified within the hepatitis C virus nucleoprotein. *J Gen Virol* 77 ( Pt 6):1305-1309.
- Kapadia SB, Chisari FV. 2005. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(7):2561-2566.
- Kato J, Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. 2002. Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo. *J Med Virol* 66(2):187-199.
- Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, Wakita T. 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125(6):1808-1817.
- Kaul A, Woerz I, Meuleman P, Leroux-Roels G, Bartenschlager R. 2007. Cell culture adaptation of hepatitis C virus and in vivo viability of an adapted variant. *J Virol* 81(23):13168-13179.
- Keck ZY, Li TK, Xia J, Gal-Tanamy M, Olson O, Li SH, Patel AH, Ball JK, Lemon SM, Fong SK. 2008. Definition of a conserved immunodominant domain on hepatitis C virus E2 glycoprotein by neutralizing human monoclonal antibodies. *J Virol* 82(12):6061-6066.
- Keskinen P, Nyqvist M, Sareneva T, Pirhonen J, Melen K, Julkunen I. 1999. Impaired antiviral response in human hepatoma cells. *Virology* 263(2):364-375.
- Kim CS, Seol SK, Song OK, Park JH, Jang SK. 2007. An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *J Virol* 81(8):3852-3865.
- Kim M, Ha Y, Park HJ. 2006. Structural requirements for assembly and homotypic interactions of the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 122(1-2):137-143.
- Kittleson DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. 2000. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 106(10):1239-1249.
- Klein KC, Polyak SJ, Lingappa JR. 2004. Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly. *J Virol* 78(17):9257-9269.
- Kneteman NM, Weiner AJ, O'Connell J, Collett M, Gao T, Aukerman L, Kovelsky R, Ni ZJ, Zhu Q, Hashash A, Kline J, Hsi B, Schiller D, Douglas D, Tyrrell DL, Mercer DF. 2006. Anti-HCV

## REFERENCES

- therapies in chimeric scid-Alb/uPA mice parallel outcomes in human clinical application. *Hepatology* 43(6):1346-1353.
- Kohara M. 2000. Hepatitis C virus replication and pathogenesis. *J Dermatol Sci* 22(3):161-168.
- Kojima M, Osuga T, Tsuda F, Tanaka T, Okamoto H. 1994. Influence of antibodies to the hypervariable region of E2/NS1 glycoprotein on the selective replication of hepatitis C virus in chimpanzees. *Virology* 204(2):665-672.
- Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. 1996. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70(6):3363-3371.
- Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. 2000. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* 74(4):2046-2051.
- Konan KV, Giddings TH, Jr., Ikeda M, Li K, Lemon SM, Kirkegaard K. 2003. Nonstructural protein precursor NS4A/B from hepatitis C virus alters function and ultrastructure of host secretory apparatus. *J Virol* 77(14):7843-7855.
- Koppel EA, van Gisbergen KP, Geijtenbeek TB, 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(2):157-165.
- Kornfeld R, Kornfeld S. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54:631-664.
- Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R. 2006. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 80(11):5308-5320.
- Kremsdorf D, Brezillon N. 2007. New animal models for hepatitis C viral infection and pathogenesis studies. *World J Gastroenterol* 13(17):2427-2435.
- Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. 2001. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* 75(10):4614-4624.
- Lagging LM, Meyer K, Owens RJ, Ray R. 1998. Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *J Virol* 72(5):3539-3546.
- Lagging M, Romero AI, Westin J, Norkrans G, Dhillon AP, Pawlotsky JM, Zeuzem S, von Wagner M, Negro F, Schalm SW, Haagmans BL, Ferrari C, Missale G, Neumann AU, Verheij-Hart E, Hellstrand K. 2006. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology* 44(6):1617-1625.
- Lai MY, Kao JH, Yang PM, Wang JT, Chen PJ, Chan KW, Chu JS, Chen DS. 1996. Long-term efficacy of ribavirin plus interferon alfa in the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 111(5):1307-1312.
- Lanford RE, Guerra B, Lee H, Averett DR, Pfeiffer B, Chavez D, Notvall L, Bigger C. 2003. Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol* 77(2):1092-1104.
- Lavillette D, Bartosch B, Nourrisson D, Verney G, Cosset FL, Penin F, Pecheur EI. 2006. Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* 281(7):3909-3917.
- Lavillette D, Morice Y, Germanidis G, Donot P, Soulier A, Pagkalos E, Sakellariou G, Intrator L, Bartosch B, Pawlotsky JM, Cosset FL. 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(10):6023-6034.
- Lavillette D, Tarr AW, Voisset C, Donot P, Bartosch B, Bain C, Patel AH, Dubuisson J, Ball JK, Cosset FL. 2005b. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 41(2):265-274.
- Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamataki Z, Gastaminza P, Chisari FV, Jones IM, Fox RI, Ball JK, McKeating JA, Kneteman NM, Burton DR. 2008. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 14(1):25-27.

## REFERENCES

- Lazaro CA, Chang M, Tang W, Campbell J, Sullivan DG, Gretch DR, Corey L, Coombs RW, Fausto N. 2007. Hepatitis C virus replication in transfected and serum-infected cultured human fetal hepatocytes. *Am J Pathol* 170(2):478-489.
- Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, Cerny A, Phillips R, Ferrari C, Pape GR, Klenerman P. 2000. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol* 30(9):2479-2487.
- Lerat H, Berby F, Trabaud MA, Vidalin O, Major M, Trepo C, Inchauspe G. 1996. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 97(3):845-851.
- Lerat H, Honda M, Beard MR, Loesch K, Sun J, Yang Y, Okuda M, Gosert R, Xiao SY, Weinman SA, Lemon SM. 2002. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 122(2):352-365.
- Levrero M. 2006. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 25(27):3834-3847.
- Levy S, Todd SC, Maecker HT. 1998. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 16:89-109.
- Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. 2005a. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(49):17717-17722.
- Li Y, Wang X, Douglas SD, Metzger DS, Woody G, Zhang T, Song L, Ho WZ. 2005b. CD8+ T cell depletion amplifies hepatitis C virus replication in peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 192(6):1093-1101.
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309(5734):623-626.
- Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, Lanford RE, Feinstone SM, Major ME, Leroux-Roels G, Rice CM. 2006. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10):3805-3809.
- Lindsay KL. 2002. Introduction to therapy of hepatitis C. *Hepatology* 36(5 Suppl 1):S114-120.
- Lindsay KL, Trepo C, Heintges T, Shiffman ML, Gordon SC, Hoefs JC, Schiff ER, Goodman ZD, Laughlin M, Yao R, Albrecht JK. 2001. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 34(2):395-403.
- Liu Q, Bhat RA, Prince AM, Zhang P. 1999. The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 254(3):572-577.
- Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. 2009. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83(4):2011-2014.
- Lo SY, Masiarz F, Hwang SB, Lai MM, Ou JH. 1995. Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology* 213(2):455-461.
- Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P, Feinstone SM, Alter H, Rice CM, McKeating JA. 2004. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(27):10149-10154.
- Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R. 2001. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 75(3):1437-1449.
- Lohmann V, Korner F, Herian U, Bartenschlager R. 1997. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* 71(11):8416-8428.
- Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285(5424):110-113.
- Loo YM, Owen DM, Li K, Erickson AK, Johnson CL, Fish PM, Carney DS, Wang T, Ishida H, Yoneyama M, Fujita T, Saito T, Lee WM, Hagedorn CH, Lau DT, Weinman SA, Lemon SM,

## REFERENCES

- 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(15):6001-6006.
- Lorenz IC, Marcotrigiano J, Dentzer TG, Rice CM. 2006. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* 442(7104):831-835.
- Loriot MA, Bronowicki JP, Lagorce D, Lakehal F, Persico T, Barba G, Mergey M, Vons C, Franco D, Belghiti J, Giacca M, Housset C, Brechot C. 1999. Permissiveness of human biliary epithelial cells to infection by hepatitis C virus. *Hepatology* 29(5):1587-1595.
- Lozach PY, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Cosset FL, Altmeyer R. 2004. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 279(31):32035-32045.
- Lubin I, Faktorowich Y, Lapidot T, Gan Y, Eshhar Z, Gazit E, Levite M, Reisner Y. 1991. Engraftment and development of human T and B cells in mice after bone marrow transplantation. *Science* 252(5004):427-431.
- Lubin I, Segall H, Marcus H, David M, Kulova L, Steinitz M, Erlich P, Gan J, Reisner Y. 1994. Engraftment of human peripheral blood lymphocytes in normal strains of mice. *Blood* 83(8):2368-2381.
- Lucas M, Ulsenheimer A, Pfafferot K, Heeg MH, Gaudieri S, Gruner N, Rauch A, Gerlach JT, Jung MC, Zachoal R, Pape GR, Schraut W, Santantonio T, Nitschko H, Obermeier M, Phillips R, Scriba TJ, Semmo N, Day C, Weber JN, Fidler S, Thimme R, Haberstroh A, Baumert TF, Klenerman P, Diepolder HM. 2007. Tracking virus-specific CD4+ T cells during and after acute hepatitis C virus infection. *PLoS One* 2(7):e649.
- Lundin M, Monne M, Widell A, Von Heijne G, Persson MA. 2003. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* 77(9):5428-5438.
- Mac CF. 1947. Collection of specimens for virus investigations. *Mon Bull Minist Health Public Health Lab Serv* 6:229-232.
- Machida K, Cheng KT, Pavio N, Sung VM, Lai MM. 2005. Hepatitis C virus E2-CD81 interaction induces hypermutation of the immunoglobulin gene in B cells. *J Virol* 79(13):8079-8089.
- Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, Gounon P, Dubuisson J, Faure G, Crainic R, Budkowska A. 2001. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* 75(17):8240-8250.
- Maillard P, Lavergne JP, Siberil S, Faure G, Roohvand F, Petres S, Teillaud JL, Budkowska A. 2004. Fcγ receptor-like activity of hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 279(4):2430-2437.
- Maire M, Parent R, Morand AL, Alotte C, Trepo C, Durantel D, Petit MA. 2008. Characterization of the double-stranded RNA responses in human liver progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 368(3):556-562.
- Maki A, Matsuda M, Asakawa M, Kono H, Fujii H, Matsumoto Y. 2003. Decreased CD3 zeta molecules of T lymphocytes from patients with hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus. *Hepatol Res* 27(4):272-278.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358(9286):958-965.
- Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Poliquin M, Degott C, Descombes I, Le Breton V, Milotova V, et al. 1995. Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 22(4 Pt 1):1050-1056.
- Martinot-Peignoux M, Roudot-Thoraval F, Mendel I, Coste J, Izopet J, Duverlie G, Payan C, Pawlotsky JM, Defer C, Bogard M, Gerolami V, Halfon P, Buisson Y, Fouqueray B, Loiseau P, Lamoril J, Lefrere JJ, Marcellin P. 1999. Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. *The GEMHEP. J Viral Hepat* 6(6):435-443.

## REFERENCES

- Masciopinto F, Giovani C, Campagnoli S, Galli-Stampino L, Colombatto P, Brunetto M, Yen TS, Houghton M, Pileri P, Abrignani S. 2004. Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur J Immunol* 34(10):2834-2842.
- Matsuura Y, Tani H, Suzuki K, Kimura-Someya T, Suzuki R, Aizaki H, Ishii K, Moriishi K, Robison CS, Whitt MA, Miyamura T. 2001. Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* 286(2):263-275.
- McConahey PJ, Dixon FJ. 1966. A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 29(2):185-189.
- McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339(21):1485-1492.
- McKeating JA, Zhang LQ, Logvinoff C, Flint M, Zhang J, Yu J, Butera D, Ho DD, Dustin LB, Rice CM, Balfe P. 2004. Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *J Virol* 78(16):8496-8505.
- McLauchlan J. 2000. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 7(1):2-14.
- McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 21(15):3980-3988.
- McMullan LK, Grakoui A, Evans MJ, Mihalik K, Puig M, Branch AD, Feinstone SM, Rice CM. 2007. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(8):2879-2884.
- McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follett EA, Seed C, Keller AJ, Cobain TJ, Krusius T, Kolho E, Naukkarinen R, et al. 1994. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 32(4):884-892.
- Mee CJ, Grove J, Harris HJ, Hu K, Balfe P, McKeating JA. 2008. Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry. *J Virol* 82(1):461-470.
- Mee CJ, Harris HJ, Farquhar MJ, Wilson G, Reynolds G, Davis C, van ISC, Balfe P, McKeating JA. 2009. Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J Virol* 83(12):6211-6221.
- Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset FL, Dragic T. 2008. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 82(7):3555-3560.
- Meertens L, Bertaux C, Dragic T. 2006. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* 80(23):11571-11578.
- Mehal WZ, Azzaroli F, Crispe IN. 2001. Antigen presentation by liver cells controls intrahepatic T cell trapping, whereas bone marrow-derived cells preferentially promote intrahepatic T cell apoptosis. *J Immunol* 167(2):667-673.
- Mehta SH, Cox A, Hoover DR, Wang XH, Mao Q, Ray S, Strathdee SA, Vlahov D, Thomas DL. 2002. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* 359(9316):1478-1483.
- Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, 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 MI, Memon MA. 2002. Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat* 9(2):84-100.
- Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Kneteman NM. 2001. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7(8):927-933.
- Meuleman P, Hesselgesser J, Paulson M, Vanwolleghem T, Desombere I, Reiser H, Leroux-Roels G. 2008. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* 48(6):1761-1768.
- Meuleman P, Leroux-Roels G. 2008. The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Res* 80(3):231-238.

## REFERENCES

- Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, de Hemptinne B, Gevaert K, Vandekerckhove J, Roskams T, Leroux-Roels G. 2005. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* 41(4):847-856.
- Meunier JC, Engle RE, Faulk K, Zhao M, Bartosch B, Alter H, Emerson SU, Cosset FL, Purcell RH, 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(12):4560-4565.
- Meunier JC, Russell RS, Goossens V, Priem S, Walter H, Depla E, Union A, Faulk KN, Bukh J, Emerson SU, Purcell RH. 2008. Isolation and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the e1 glycoprotein of hepatitis C virus. *J Virol* 82(2):966-973.
- Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437(7062):1167-1172.
- Michalak JP, Wychowski C, Choukhi A, Meunier JC, Ung S, Rice CM, Dubuisson J. 1997. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* 78 ( Pt 9):2299-2306.
- Miller RH, Purcell RH. 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(6):2057-2061.
- Missale G, Cariani E, Ferrari C. 2004. Role of viral and host factors in HCV persistence: which lesson for therapeutic and preventive strategies? *Dig Liver Dis* 36(11):703-711.
- Miyamoto H, Okamoto H, Sato K, Tanaka T, Mishiro S. 1992. Extraordinarily low density of hepatitis C virus estimated by sucrose density gradient centrifugation and the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 73 ( Pt 3):715-718.
- Miyazari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9(9):1089-1097.
- Miyazari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K. 2003. Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem* 278(50):50301-50308.
- Mizutani T, Kato N, Ikeda M, Sugiyama K, Shimotohno K. 1996. Long-term human T-cell culture system supporting hepatitis C virus replication. *Biochem Biophys Res Commun* 227(3):822-826.
- Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, Roitelman J, Barbaras R, Graber P, Ghersa P, Smolarsky M, Funaro A, Malavasi F, Larrey D, Coste J, Fabre JM, Sa-Cunha A, Maurel P. 2007. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 46(3):411-419.
- Molina S, Castet V, Pichard-Garcia L, Wychowski C, Meurs E, Pascussi JM, Sureau C, Fabre JM, Sacunha A, Larrey D, Dubuisson J, Coste J, McKeating J, Maurel P, Fournier-Wirth C. 2008. Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol* 82(1):569-574.
- Monazahian M, Bohme I, Bonk S, Koch A, Scholz C, Grethe S, Thomssen R. 1999. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 57(3):223-229.
- Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R, Blum HE, Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V. 2004. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78(23):13278-13284.
- Moradpour D, Penin F, Rice CM. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5(6):453-463.
- Moradpour D, Wolk B, Cerny A, Heim MH, Blum HE. 2001. Hepatitis C: a concise review. *Minerva Med* 92(5):329-339.

## REFERENCES

- Morikawa K, Zhao Z, Date T, Miyamoto M, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, Wakita T. 2007. The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol* 79(6):714-723.
- Mottola G, Cardinali G, Ceccacci A, Trozzi C, Bartholomew L, Torrisi MR, Pedrazzini E, Bonatti S, Migliaccio G. 2002. Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. *Virology* 293(1):31-43.
- Murao K, Imachi H, Yu X, Cao WM, Nishiuchi T, Chen K, Li J, Ahmed RA, Wong NC, Ishida T. 2008. Interferon alpha decreases expression of human scavenger receptor class BI, a possible HCV receptor in hepatocytes. *Gut* 57(5):664-671.
- Nahmias Y, Casali M, Barbe L, Berthiaume F, Yarmush ML. 2006. Liver endothelial cells promote LDL-R expression and the uptake of HCV-like particles in primary rat and human hepatocytes. *Hepatology* 43(2):257-265.
- Nakai K, Okamoto T, Kimura-Someya T, Ishii K, Lim CK, Tani H, Matsuo E, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Miyamura T, Nunberg JH, Moriishi K, Matsuura Y. 2006. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J Virol* 80(22):11265-11273.
- Nakajima N, Hijikata M, Yoshikura H, Shimizu YK. 1996. Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. *J Virol* 70(5):3325-3329.
- Nalpas B, Delarouques-Astagneau E, Bihan CL, Drucker J, Desenclos JC. 1998. Medical practices regarding hepatitis C virus infection in Europe. *J Viral Hepat* 5(2):131-141.
- Namboodiri AM, Nietert PJ, Pandey JP. 2008. Hepatitis C virus core protein discriminates between the two IgG2 allotypes. *Viral Immunol* 21(2):273-276.
- Ndongo N, Rechoum Y, De Sequeira S, Zoulim F, Trepo C, Drouet E, Petit MA. 2009. Inhibition of the binding of HCV serum particles to human hepatocytes by E1E2-specific D32.10 monoclonal antibody. *J Med Virol* 81(10):1726-1733.
- Negre D, Cosset FL. 2002. Vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV). *Biochimie* 84(11):1161-1171.
- Negro F. 2006. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 12(42):6756-6765.
- Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechockchai W, Toms GL. 2006. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* 80(5):2418-2428.
- Noguchi M, Hirohashi S. 1996. Cell lines from non-neoplastic liver and hepatocellular carcinoma tissue from a single patient. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32(3):135-137.
- Noguchi T, Satoh S, Noshi T, Hatada E, Fukuda R, Kawai A, Ikeda S, Hijikata M, Shimotohno K. 2001. Effects of mutation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A on interferon resistance mediated by inhibition of PKR kinase activity in mammalian cells. *Microbiol Immunol* 45(12):829-840.
- Nomura-Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Kitazawa S, Ishido S, Sada K, Hotta H. 2006. Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol* 87(Pt 7):1935-1945.
- Nousbaum JB, Pol S, Nalpas B, Landais P, Berthelot P, Brechot C. 1995. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med* 122(3):161-168.
- Oates JF. 2006. Is the chimpanzee, *Pan troglodytes*, an endangered species? It depends on what "endangered" means. *Primates* 47(1):102-112.
- Okamoto H, Kurai K, Okada S, Yamamoto K, Lizuka H, Tanaka T, Fukuda S, Tsuda F, Mishiro S. 1992. Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 188(1):331-341.

## REFERENCES

- Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. 2006. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J* 25(20):5015-5025.
- Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, Weinman SA. 2002. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122(2):366-375.
- Olenina LV, Kuzmina TI, Sobolev BN, Kuraeva TE, Kolesanova EF, Archakov AI. 2005. Identification of glycosaminoglycan-binding sites within hepatitis C virus envelope glycoprotein E2\*. *J Viral Hepat* 12(6):584-593.
- Op De Beeck A, Cocquerel L, Dubuisson J. 2001. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 82(Pt 11):2589-2595.
- Ott DE. 1997. Cellular proteins in HIV virions. *Rev Med Virol* 7(3):167-180.
- Otto GA, Puglisi JD. 2004. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* 119(3):369-380.
- Owsianka A, Clayton RF, Loomis-Price LD, McKeating JA, Patel AH. 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(Pt 8):1877-1883.
- Owsianka A, Tarr AW, Juttla VS, Lavillette D, Bartosch B, Cosset FL, Ball JK, Patel AH. 2005. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J Virol* 79(17):11095-11104.
- Parent R, Beretta L. 2008. Translational control plays a prominent role in the hepatocytic differentiation of HepaRG liver progenitor cells. *Genome Biol* 9(1):R19.
- Parent R, Marion MJ, Furio L, Trepo C, Petit MA. 2004. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* 126(4):1147-1156.
- Parent R, Qu X, Petit MA, Beretta L. 2009. The heat shock cognate protein 70 is associated with hepatitis C virus particles and modulates virus infectivity. *Hepatology* 49(6):1798-1809.
- Park JS, Yang JM, Min MK. 2000. Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* 267(2):581-587.
- Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, 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(10):6104-6108.
- Pawlotsky JM. 2006. Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets. *J Hepatol* 44(1 Suppl):S10-13.
- Pawlotsky JM, Benchiki H, Pellet C, Duval J, Dhumeaux D, Revuz J, Bagot M. 1995. Lichen planus and hepatitis C virus (HCV)-related chronic hepatitis: evaluation of HCV genotypes. *Br J Dermatol* 133(4):666-667.
- Pawlotsky JM, Dahari H, Neumann AU, Hezode C, Germanidis G, Lonjon I, Castera L, Dhumeaux D. 2004. Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 126(3):703-714.
- Penin F, Combet C, Germanidis G, Frainais PO, Deleage G, Pawlotsky JM. 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(12):5703-5710.
- Persico M, Persico E, Suozzo R, Conte S, De Seta M, Coppola L, Palmentieri B, Sasso FC, Torella R. 2000. Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology* 118(4):760-764.
- Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, Schurmann P, Bartosch B, Cosset FL, Patel AH, Meisel H, Baumert J, Viazov S, Rispeter K, Blum HE, Roggendorf M, Baumert TF. 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(14):6025-6030.
- Petit MA, Jolivet-Reynaud C, Peronnet E, Michal Y, Trepo C. 2003. Mapping of a conformational epitope shared between E1 and E2 on the serum-derived human hepatitis C virus envelope. *J Biol Chem* 278(45):44385-44392.

## REFERENCES

- Petit MA, Lievre M, Peyrol S, De Sequeira S, Berthillon P, Ruigrok RW, Trepo C. 2005. Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. *Virology* 336(2):144-153.
- Pichard-Garcia L, Gerbal-Chaloin S, Ferrini JB, Fabre JM, Maurel P. 2002. Use of long-term cultures of human hepatocytes to study cytochrome P450 gene expression. *Methods Enzymol* 357:311-321.
- Pieroni L, Santolini E, Fipaldini C, Pacini L, Migliaccio G, La Monica N. 1997. In vitro study of the NS2-3 protease of hepatitis C virus. *J Virol* 71(9):6373-6380.
- Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, Bartenschlager R. 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(19):7408-7413.
- Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, Bartenschlager R. 2002. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 76(8):4008-4021.
- Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R. 2001. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 75(3):1252-1264.
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282(5390):938-941.
- Pinschewer DD, Perez M, Jeetendra E, Bachi T, Horvath E, Hengartner H, Whitt MA, de la Torre JC, Zinkernagel RM. 2004. Kinetics of protective antibodies are determined by the viral surface antigen. *J Clin Invest* 114(7):988-993.
- Pol S, Thiers V, Noursbaum JB, Legendre C, Berthelot P, Kreis H, Brechot C. 1995. The changing relative prevalence of hepatitis C virus genotypes: evidence in hemodialyzed patients and kidney recipients. *Gastroenterology* 108(2):581-583.
- Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. 2001. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 75(13):6095-6106.
- Poynard T, Leroy V, Mathurin P, Cohard M, Opolon P, Zarski JP. 1996. Treatment of chronic hepatitis C by interferon for longer duration than six months. *Dig Dis Sci* 41(12 Suppl):99S-102S.
- Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. 1998. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 352(9138):1426-1432.
- Pozzato G, Kaneko S, Moretti M, Croce LS, Franzin F, Unoura M, Bercich L, Tiribelli C, Crovatto M, Santini G, et al. 1994. Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease. *J Med Virol* 43(3):291-296.
- Prati D, Capelli C, Zanella A, Mozzi F, Bosoni P, Pappalettera M, Zanuso F, Vianello L, Locatelli E, de Fazio C, Ronchi G, del Ninno E, Colombo M, Sirchia G. 1996. Influence of different hepatitis C virus genotypes on the course of asymptomatic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 110(1):178-183.
- Preiss S, Thompson A, Chen X, Rodgers S, Markovska V, Desmond P, Visvanathan K, Li K, Locarnini S, Revill P. 2008. Characterization of the innate immune signalling pathways in hepatocyte cell lines. *J Viral Hepat* 15(12):888-900.
- Prince AM, Brotman B. 2001. Perspectives on hepatitis B studies with chimpanzees. *ILAR J* 42(2):85-88.
- Prince AM, Brotman B, Lee DH, Ren L, Moore BS, Scheffel JW. 1999. Significance of the anti-E2 response in self-limited and chronic hepatitis C virus infections in chimpanzees and in humans. *J Infect Dis* 180(4):987-991.
- Ray RB, Ray R. 2001. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett* 202(2):149-156.

## REFERENCES

- Raymond VA, Selliah S, Ethier C, Houle R, Jouan L, Maniere T, Lamarre D, Willems B, Bilodeau M. 2009. Primary cultures of human hepatocytes isolated from hepatitis C virus-infected cirrhotic livers as a model to study hepatitis C infection. *Liver Int* 29(6):942-949.
- Regeard M, Trotard M, Lepere C, Gripon P, Le Seyec J. 2008. Entry of pseudotyped hepatitis C virus into primary human hepatocytes depends on the scavenger class B type I receptor. *J Viral Hepat* 15(12):865-870.
- Reid AE, Koziel MJ, Aiza I, Jeffers L, Reddy R, Schiff E, Lau JY, Dienstag JL, Liang TJ. 1999. Hepatitis C virus genotypes and viremia and hepatocellular carcinoma in the United States. *Am J Gastroenterol* 94(6):1619-1626.
- Reynolds GM, Harris HJ, Jennings A, Hu K, Grove J, Lalor PF, Adams DH, Balfe P, Hubscher SG, McKeating JA. 2008. Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *Hepatology* 47(2):418-427.
- Rhainds D, Bourgeois P, Bourret G, Huard K, Falstrault L, Brissette L. 2004. Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J Cell Sci* 117(Pt 15):3095-3105.
- Rijnbrand R, Bredenbeek PJ, Haasnoot PC, Kieft JS, Spaan WJ, Lemon SM. 2001. The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *RNA* 7(4):585-597.
- Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin i T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L, Weiner A. 1998. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol* 143(12):2493-2503.
- 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, Cocquerel L. 2008. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS One* 3(4):e1866.
- Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA. 2005. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 175(8):5260-5268.
- Rothwangl KB, Manicassamy B, Uprichard SL, Rong L. 2008. Dissecting the role of putative CD81 binding regions of E2 in mediating HCV entry: putative CD81 binding region 1 is not involved in CD81 binding. *Virol J* 5:46.
- Rouille Y, Helle F, Delgrange D, Roingeard P, Voisset C, Blanchard E, Belouzard S, McKeating J, Patel AH, Maertens G, Wakita T, Wychowski C, Dubuisson J. 2006. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol* 80(6):2832-2841.
- Roussel J, Pillez A, Montpellier C, Duverlie G, Cahour A, Dubuisson J, Wychowski C. 2003. Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *J Gen Virol* 84(Pt 7):1751-1759.
- Ruggieri A, Argentini C, Kouruma F, Chionne P, D'Ugo E, Spada E, Dettori S, Sabbatani S, Rapicetta M. 1996. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 2 variants in West Central Africa (Guinea Conakry). *J Gen Virol* 77 ( Pt 9):2073-2076.
- Rumin S, Berthillon P, Tanaka E, Kiyosawa K, Trabaud MA, Bizollon T, Gouillat C, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Inchauspe G, 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.
- Sainz B, Jr., Barretto N, Uprichard SL. 2009a. Hepatitis C virus infection in phenotypically distinct Huh7 cell lines. *PLoS One* 4(8):e6561.
- Sainz B, Jr., TenCate V, Uprichard SL. 2009b. Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection. *Virol J* 6:103.
- Saito T, Gale M, Jr. 2008. Regulation of innate immunity against hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 38(2):115-122.
- Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, 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(20):11646-11651.

## REFERENCES

- Sakamoto H, Okamoto K, Aoki M, Kato H, Katsume A, Ohta A, Tsukuda T, Shimma N, Aoki Y, Arisawa M, Kohara M, Sudoh M. 2005. Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol* 1(6):333-337.
- Sandrin V, Boson B, Salmon P, Gay W, Negre D, Le Grand R, Trono D, Cosset FL. 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(3):823-832.
- Santantonio T, Wiegand J, Gerlach JT. 2008. Acute hepatitis C: current status and remaining challenges. *J Hepatol* 49(4):625-633.
- Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. 1994. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 68(6):3631-3641.
- Santolini E, Pacini L, Fipaldini C, Migliaccio G, Monica N. 1995. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol* 69(12):7461-7471.
- Sarobe P, Huarte E, Lasarte JJ, Lopez-Diaz de Cerio A, Garcia N, Borrás-Cuesta F, Prieto J. 2001. Characterization of an immunologically conserved epitope from hepatitis C virus E2 glycoprotein recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Hepatol* 34(2):321-329.
- Sarobe P, Lasarte JJ, Zabaleta A, Arribillaga L, Arina A, Melero I, Borrás-Cuesta F, Prieto J. 2003. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *J Virol* 77(20):10862-10871.
- Sato K, Okamoto H, Aihara S, Hoshi Y, Tanaka T, Mishihiro S. 1993. Demonstration of sugar moiety on the surface of hepatitis C virions recovered from the circulation of infected humans. *Virology* 196(1):354-357.
- Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. 2000. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology* 270(2):476-487.
- Saunier B, Triyatni M, Ulianich L, Maruvada P, Yen P, Kohn LD. 2003. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol* 77(1):546-559.
- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21(19):5017-5025.
- Schmidt-Mende J, Bieck E, Hugle T, Penin F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. 2001. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 276(47):44052-44063.
- Schwartz M, Chen J, Lee WM, Janda M, Ahlquist P. 2004. Alternate, virus-induced membrane rearrangements support positive-strand RNA virus genome replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(31):11263-11268.
- Seeger C. 2005. Salient molecular features of hepatitis C virus revealed. *Trends Microbiol* 13(11):528-534.
- Serafino A, Valli MB, Andreola F, Crema A, Ravagnan G, Bertolini L, Carloni G. 2003. Suggested role of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum for crucial sites of hepatitis C virus replication in human lymphoblastoid cells infected in vitro. *J Med Virol* 70(1):31-41.
- Shavinskaya A, Boulant S, Penin F, McLauchlan J, 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(51):37158-37169.
- Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, Murakami S. 2006. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol* 80(7):3332-3340.
- Shimizu M, Osada K, Okamoto H. 1996. Transfusion-transmitted hepatitis G virus following open heart surgery. *Transfusion* 36(10):937.

## REFERENCES

- Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Shapiro M, Wong DC, Purcell RH, Yoshikura H. 1998. Infection of a chimpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture. *J Gen Virol* 79 ( Pt 6):1383-1386.
- Shimizu YK, Yoshikura H. 1994. Multicycle infection of hepatitis C virus in cell culture and inhibition by alpha and beta interferons. *J Virol* 68(12):8406-8408.
- Shimoike T, Koyama C, Murakami K, Suzuki R, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. 2006. Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop III<sub>d</sub> domain of IRES and the viral core protein. *Virology* 345(2):434-445.
- Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y, Miyamura T. 1999. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol* 73(12):9718-9725.
- Silini E, Bono F, Cividini A, Cerino A, Bruno S, Rossi S, Belloni G, Brugnetti B, Civardi E, Salvaneschi L, et al. 1995. Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities. *Hepatology* 21(2):285-290.
- Simmonds P. 1995. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 21(2):570-583.
- Simmonds P. 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* 85(Pt 11):3173-3188.
- Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC. 1994. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* 75 ( Pt 5):1053-1061.
- Sithebe NP, Kew MC, Mphahlele MJ, Paterson AC, Lecatsas G, Kramvis A, de Klerk W. 2002. Lack of susceptibility of Chacma baboons (*Papio ursinus orientalis*) to hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 66(4):468-471.
- Sklan EH, Charuworn P, Pang PS, Glenn JS. 2009. Mechanisms of HCV survival in the host. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6(4):217-227.
- Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, Davidson F, Kolberg J, Urdea M, Yap PL, Simmonds P. 1995. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol* 76 ( Pt 7):1749-1761.
- Spahn CM, Kieft JS, Grassucci RA, Penczek PA, Zhou K, Doudna JA, Frank J. 2001. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291(5510):1959-1962.
- Steinman RM, Hemmi H. 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 311:17-58.
- Steinmann D, Barth H, Gissler B, Schurmann P, Adah MI, Gerlach JT, Pape GR, Depla E, Jacobs D, Maertens G, Patel AH, Inchauspe G, Liang TJ, Blum HE, Baumert TF. 2004. Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C. *J Virol* 78(17):9030-9040.
- Stockert RJ. 1995. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev* 75(3):591-609.
- Sugawara Y, Makuuchi M. 2006. Liver transplantation for hepatitis B-related cirrhosis: recent advances. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 13(5):378-381.
- Sumpter R, Jr., Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M, Jr. 2005. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 79(5):2689-2699.
- Szabo E, Lotz G, Paska C, Kiss A, Schaff Z. 2003. Viral hepatitis: new data on hepatitis C infection. *Pathol Oncol Res* 9(4):215-221.
- Takada N, Takase S, Takada A. 1993. Effects of genotypes of hepatitis C virus on interferon treatment for chronic type C hepatitis. *Gastroenterol Jpn* 28(2):268-275.
- Tan SL, Katze MG. 2001. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 284(1):1-12.
- Tan SL, Nakao H, He Y, Vijaysri S, Neddermann P, Jacobs BL, Mayer BJ, Katze MG. 1999. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2

## REFERENCES

- adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10):5533-5538.
- Tarr AW, Owsianka AM, Jayaraj D, Brown RJ, Hickling TP, Irving WL, Patel AH, Ball JK. 2007. Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *J Gen Virol* 88(Pt 11):2991-3001.
- Tarr AW, Owsianka AM, Timms JM, McClure CP, Brown RJ, Hickling TP, Pietschmann T, Bartenschlager R, Patel AH, Ball JK. 2006. Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. *Hepatology* 43(3):592-601.
- Tellinghuisen TL, Evans MJ, von Hahn T, You S, Rice CM. 2007. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol* 81(17):8853-8867.
- Tellinghuisen TL, Rice CM. 2002. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol* 5(4):419-427.
- Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, Nolt K, Nelson KE, Strathdee SA, Johnson L, Laeyendecker O, Boitnott J, Wilson LE, Vlahov D. 2000. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA* 284(4):450-456.
- Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461(7265):798-801.
- Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Kochel HG, Uy A. 1992. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* 181(5):293-300.
- Thomssen R, Bonk S, Thiele A. 1993. Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol* 182(6):329-334.
- Timm J, Roggendorf M. 2007. Sequence diversity of hepatitis C virus: implications for immune control and therapy. *World J Gastroenterol* 13(36):4808-4817.
- Tokita H, Okamoto H, Iizuka H, Kishimoto J, Tsuda F, Lesmana LA, Miyakawa Y, Mayumi M. 1996. Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups. *J Gen Virol* 77 ( Pt 2 ):293-301.
- Tokita H, Okamoto H, Luengrojanakul P, Vareesangthip K, Chainuvati T, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. 1995. Hepatitis C virus variants from Thailand classifiable into five novel genotypes in the sixth (6b), seventh (7c, 7d) and ninth (9b, 9c) major genetic groups. *J Gen Virol* 76 ( Pt 9):2329-2335.
- Tokita H, Shrestha SM, Okamoto H, Sakamoto M, Horikita M, Iizuka H, Shrestha S, Miyakawa Y, Mayumi M. 1994. Hepatitis C virus variants from Nepal with novel genotypes and their classification into the third major group. *J Gen Virol* 75 ( Pt 4):931-936.
- Trestard A, Bacq Y, Buzelay L, Dubois F, Barin F, Goudeau A, Roingeard P. 1998. Ultrastructural and physicochemical characterization of the hepatitis C virus recovered from the serum of an agammaglobulinemic patient. *Arch Virol* 143(11):2241-2245.
- Triyatni M, Vergalla J, Davis AR, Hadlock KG, Fong SK, Liang TJ. 2002. Structural features of envelope proteins on hepatitis C virus-like particles as determined by anti-envelope monoclonal antibodies and CD81 binding. *Virology* 298(1):124-132.
- Tseng CT, Klimpel GR. 2002. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 195(1):43-49.
- Tsubouchi E, Akbar SM, Horiike N, Onji M. 2004. Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 39(8):754-762.
- Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66(3):1476-1483.
- Turksen K, Troy TC. 2004. Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 117(Pt 12):2435-2447.

## REFERENCES

- Umehara T, Fukuda K, Nishikawa F, Sekiya S, Kohara M, Hasegawa T, Nishikawa S. 2004. Designing and analysis of a potent bi-functional aptamers that inhibit protease and helicase activities of HCV NS3. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*(48):195-196.
- Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari C. 2006. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* 80(22):11398-11403.
- Vanwolleghem T, Meuleman P, Libbrecht L, Roskams T, De Vos R, Leroux-Roels G. 2007. Ultra-rapid cardiotoxicity of the hepatitis C virus protease inhibitor BILN 2061 in the urokinase-type plasminogen activator mouse. *Gastroenterology* 133(4):1144-1155.
- Vauloup-Fellous C, Pene V, Garaud-Aunis J, Harper F, Bardin S, Suire Y, Pichard E, Schmitt A, Sogni P, Pierron G, Briand P, Rosenberg AR. 2006. Signal peptide peptidase-catalyzed cleavage of hepatitis C virus core protein is dispensable for virus budding but destabilizes the viral capsid. *J Biol Chem* 281(38):27679-27692.
- Voisset C, Callens N, Blanchard E, Op De Beeck A, Dubuisson J, Vu-Dac N. 2005. High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* 280(9):7793-7799.
- von Hahn T, Lindenbach BD, Boullier A, Quehenberger O, Paulson M, Rice CM, McKeating JA. 2006. Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology* 43(5):932-942.
- von Hahn T, Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehmann B, Balfe P, McKeating JA. 2007. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 132(2):667-678.
- Wack A, Soldaini E, Tseng C, Nuti S, Klimpel G, Abrignani S. 2001. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *Eur J Immunol* 31(1):166-175.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11(7):791-796.
- Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7(5):710-721.
- Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. 1993. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 67(6):3338-3344.
- Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. 2005. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 19(1):111-122.
- Weber F. 2007. Interaction of hepatitis C virus with the type I interferon system. *World J Gastroenterol* 13(36):4818-4823.
- Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo QL, Houghton M, 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(2):842-848.
- Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, Bonino F, Crawford K, Marion CD, Crawford KA, et al. 1992. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(8):3468-3472.
- Weiner AJ, Paliard X, Selby MJ, Medina-Selby A, Coit D, Nguyen S, Kansopon J, Arian CL, Ng P, Tucker J, Lee CT, Polakos NK, Han J, Wong S, Lu HH, Rosenberg S, Brasky KM, Chien D, Kuo G, Houghton M. 2001. Intrahepatic genetic inoculation of hepatitis C virus RNA confers cross-protective immunity. *J Virol* 75(15):7142-7148.
- Wellnitz S, Klumpp B, Barth H, Ito S, Depla E, Dubuisson J, Blum HE, Baumert TF. 2002. Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. *J Virol* 76(3):1181-1193.
- Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR. 2003. Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology* 37(3):577-589.

## REFERENCES

- Wolk B, Sansonno D, Krausslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, 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(5):2293-2304.
- Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, Guillen J, Su JH, Civeira MP, Prieto J. 1998. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 244(2):513-520.
- Xiong XY, Liu X, Chen YD. 2005. Expression and immunoreactivity of HCV/HBV epitopes. *World J Gastroenterol* 11(41):6440-6444.
- Xu Z, Choi J, Lu W, Ou JH. 2003. Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol* 77(2):1578-1583.
- Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J. 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 20(14):3840-3848.
- Yagnik AT, Lahm A, Meola A, Roccasecca RM, Ercole BB, Nicosia A, Tramontano A. 2000. A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins* 40(3):355-366.
- Yamada E, Montoya M, Schuettler CG, Hickling TP, Tarr AW, Vitelli A, Dubuisson J, Patel AH, Ball JK, Borrow P. 2005. Analysis of the binding of hepatitis C virus genotype 1a and 1b E2 glycoproteins to peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Gen Virol* 86(Pt 9):2507-2512.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4(11):1144-1150.
- Yang W, Qiu C, Biswas N, Jin J, Watkins SC, Montelaro RC, Coyne CB, 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(13):8643-8653.
- Yao ZQ, Eisen-Vandervelde A, Ray S, Hahn YS. 2003. HCV core/gC1qR interaction arrests T cell cycle progression through stabilization of the cell cycle inhibitor p27Kip1. *Virology* 314(1):271-282.
- Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M. 1998. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 72(7):6048-6055.
- Ye J, Wang C, Sumpter R, Jr., Brown MS, Goldstein JL, Gale M, Jr. 2003. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26):15865-15870.
- Yi Z, Fang C, Pan T, Wang J, Yang P, Yuan Z. 2006. Subproteomic study of hepatitis C virus replicon reveals Ras-GTPase-activating protein binding protein 1 as potential HCV RC component. *Biochem Biophys Res Commun* 350(1):174-178.
- Yoneyama H, Ichida T. 2005. Recruitment of dendritic cells to pathological niches in inflamed liver. *Med Mol Morphol* 38(3):136-141.
- Yoneyama K, Yamaguchi M, Kiuchi Y, Morizane T, Shibata M, Mitamura K. 2002. Analysis of background factors influencing long-term prognosis of patients with chronic hepatitis C treated with interferon. *Intervirol* 45(1):11-19.
- Yu H, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. 2007. Immunity and protection by adoptive transfer of dendritic cells transfected with hepatitis C NS3/4A mRNA. *Vaccine* 25(10):1701-1711.
- Yu H, Huang H, Xiang J, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. 2006. Dendritic cells pulsed with hepatitis C virus NS3 protein induce immune responses and protection from infection with recombinant vaccinia virus expressing NS3. *J Gen Virol* 87(Pt 1):1-10.
- Zannis VI, Chroni A, Krieger M. 2006. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med* 84(4):276-294.
- Zein NN, Persing DH. 1996. Hepatitis C genotypes: current trends and future implications. *Mayo Clin Proc* 71(5):458-462.
- Zeisel MB, Cosset FL, Baumert TF. 2008. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 48(1):299-307.

## REFERENCES

- Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF. 2007. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 46(6):1722-1731.
- Zemel R, Kazatsker A, Greif F, Ben-Ari Z, Greif H, Almog O, Tur-Kaspa R. 2000. Mutations at vicinity of catalytic sites of hepatitis C virus NS3 serine protease gene isolated from hepatocellular carcinoma tissue. *Dig Dis Sci* 45(11):2199-2202.
- Zeuzem S, Herrmann E, Lee JH, Fricke J, Neumann AU, Modi M, Colucci G, Roth WK. 2001. Viral kinetics in patients with chronic hepatitis C treated with standard or peginterferon alpha2a. *Gastroenterology* 120(6):1438-1447.
- Zhang J, Randall G, Higginbottom A, Monk P, Rice CM, McKeating JA. 2004. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 78(3):1448-1455.
- Zhang S, Chelius D. 2004. Characterization of protein glycosylation using chip-based infusion nanoelectrospray linear ion trap tandem mass spectrometry. *J Biomol Tech* 15(2):120-133.
- Zhao X, Tang ZY, Klumpp B, Wolff-Vorbeck G, Barth H, Levy S, von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF. 2002. Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 109(2):221-232.
- Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, Song X, Ding M, Deng H. 2007. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 81(22):12465-12471.
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26):9294-9299.
- Zibert A, Schreier E, Roggendorf M. 1995. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology* 208(2):653-661.
- Zuckerman AJ. 1976. Hepatitis-B vaccine. Safety criteria and non-B infection. *Lancet* 1(7974):1396-1397.