

Université du Québec

INRS-Institut Armand-Frappier

**«Inhibition de l'infection du virus de l'hépatite C par la proprotéine
convertase PCSK9»**

Par

Syntia Begley

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.) en Virologie & immunologie

Directeur de recherche : Dr. Patrick Labonté, INRS-IAF

Examineur interne : Dr. Alain Lamarre, INRS-IAF

Examinatrice externe : Dr. Caroline Alfieri, CHU St-Justine

12 mai 2009

Droits réservés de Syntia Begley 2009

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier mon directeur de recherche, Dr. Patrick Labonté, pour m'avoir permis de réaliser une maîtrise dans son laboratoire dans un environnement convivial et respectueux. Je remercie mon collègue de laboratoire Carl Guévin pour son support technique et ses précieux conseils. Je remercie profondément mon amie et collègue Claudia Bélanger pour sa présence réconfortante, sa bonne humeur et son amitié.

Je remercie notre collaborateur de recherche, Dr. Nabil G.Seidah, pour sa participation à ce projet.

Je désire remercier ma sœur Stéphanie pour son écoute attentive, sa compréhension et pour la fierté qu'elle a mon égard. Mes amies ont aussi été pour moi une source de motivation et je les remercie profondément de leur soutien moral et de leur douce compagnie.

Sans plus ni moins, je remercie mon fiancé Marc, pour m'enseigner les vertus du bonheur et des petits plaisirs de la vie et pour son soutien incommensurable.

SOMMAIRE

Les proprotéines convertases (PC) sont responsables de rendre biologiquement actives des protéines précurseurs essentielles à divers mécanismes physiologiques. Certaines d'entre elles participent au métabolisme du cholestérol. Parmi celles-ci, PCSK9, la dernière PC identifiée a suscité rapidement l'attention lorsqu'elle a été associée à l'hypercholestérolémie familiale, maladie grave causant des problèmes cardiovasculaires majeurs. Les études se sont rapidement multipliées et ont abouti à la conclusion que des mutations dans le gène de PCSK9 empêchaient la dégradation lysosomale du récepteur du cholestérol, le LDLR. En effet, le rôle principal de PCSK9 est de réguler le niveau d'expression du LDLR à la surface des hépatocytes. Récemment, plusieurs membres des PC ont été associés dans le clivage des glycoprotéines de surface de certains virus pour ainsi permettre leurs maturations.

Les expérimentations exposées dans ce mémoire avaient pour objectif d'observer l'effet de la proprotéine convertase PCSK9 sur l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC), plus particulièrement en étudiant son effet sur trois de ses récepteurs, soit le LDLR, le CD81 et le SR-BI. Pour ce faire, nous avons utilisé une forme plus active et non sécrétée de PCSK9, soit PCSK9-ACE2. Nos résultats montrent que cette chimère de PCSK9 a la capacité d'inhiber significativement le VHC en diminuant le niveau d'expression à la surface cellulaire du LDLR, mais également du CD81. Cette inhibition de l'expression de CD81, facteur essentiel à la pénétration du virus dans la cellule, a aussi été observée dans des tissus de souris transgéniques surexprimant PCSK9.

Les résultats générés durant cette maîtrise sont les premiers à exposer un effet antiviral d'une proprotéine convertase sur l'infection par le VHC et surtout, les premiers à démontrer que PCSK9 interagit avec CD81, le récepteur crucial à l'infection du VHC. Les données colligées dans ce mémoire suggèrent que PCSK9 est une nouvelle cible thérapeutique pour le développement d'un antiviral.

TABLE DES MATIÈRES

<i>PAGE TITRE</i>	<i>I</i>
<i>REMERCIEMENTS</i>	<i>II</i>
<i>SOMMAIRE</i>	<i>III</i>
<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	<i>IV</i>
<i>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</i>	<i>VI</i>
<i>LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX</i>	<i>IX</i>
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
SECTION 1 : LE VIRUS DE L'HEPATITE C	4
1.1 Généralités	4
1.2 Mode de transmission	4
1.3 Pathologie	4
1.3 Organisation génomique du VHC.....	6
1.3.1 Génome	6
1.3.2 Protéines virales	7
1.4 Système de réplication et d'infection.....	9
1.5 Propriétés physicochimiques du VHC	12
1.6 Entrée et récepteurs cellulaires	15
1.6.1 CD81	16
1.6.2 LDLR	18
1.6.3 SR-B1	19
1.6.4 Claudin 1, 6, 9	21
1.6.5 GAG, lectines (L-SIGN et DC-SIGN) et ASGPR	22
1.7 Attachement et fusion	23
1.8 Réplication, assemblage et bourgeonnement.....	24
SECTION 2. LES PROPROTEINES CONVERTASES	27
2.1 Généralités	27

	V
2.2 Clivage protéolytique.....	28
2.3 PC1/3.....	29
2.4 PC2.....	29
2.5 La Furine.....	30
2.6 PC5/PC6.....	30
2.7 PACE4.....	31
2.8 PC7.....	32
2.9 SKI-1.....	32
2.10 Les proprotéines convertases et les agents infectieux.....	33
SECTION 3. LA PROPROTEINE CONVERTASE SUBSTITILISIN KEXIN DE TYPE 9	33
3.1 Généralités	33
3.2 Structure.....	34
3.3 Maturation.....	35
3.4 Mécanismes d'action	35
3.5 Dyslipidémie et mutants de PCSK9.....	38
3.5.1 Notions sur l'homéostasie des lipides.....	38
3.5.2 Rôle de PCSK9 dans la dyslipidémie	39
3.6 Régulation de PCSK9	41
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....	43
CHAPITRE 2	44
<i>Contribution des auteurs.....</i>	<i>45</i>
<i>Version acceptée de l'Article.....</i>	<i>46</i>
CHAPITRE 3	82
<i>Discussion générale et conclusion.....</i>	<i>82</i>
BIBLIOGRAPHIE.....	90
<i>Liste des références.....</i>	<i>90</i>

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

a.a.	acides aminés
ADH	<i>autosomal dominant hypercholesterolemia</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
apoB, E	apolipoprotéine B, apolipoprotéine E
ApoER2	<i>apolipoprotein receptor-2</i>
ARH	<i>autosomal recessive hypercholesterolemia</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNi	ARN d'interférence
ASGPR	<i>asialoglycoproteins</i>
ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
CLDN-1	<i>claudin-1</i>
CD81	<i>cluster of differentiation 81</i>
CREB4	<i>cAMP response element-binding 4</i>
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
E1, E2	protéine de l'enveloppe 1, protéine de l'enveloppe 2
E2s	E2 soluble
EC	extracellulaire
ECMV	<i>encephalochoriomeningitis virus</i>
GAG	glycosaminoglycans
HDL	<i>high-density lipoproteins</i>
HDL-c	HDL cholestérol
IgM	immunoglobuline M
IgG	immunoglobuline G
HSPG	<i>heparan sulfate proteoglycan</i>
HVR	<i>hypervariable region</i>

IGF	<i>Insulin growth factor</i>
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
JFH-1	<i>Japanese fulminant hepatitis type 1</i>
kb	kilo base
kDa	kilodalton
kpb	kilo paire de base
LD	<i>lipid droplet</i>
LDL	<i>low-density lipoproteins</i>
LDL-c	LDL cholestérol
LDLR	LDL récepteur
LEL	<i>large extracellular loop</i>
L-SIGN	<i>adhesion molecule-3-grabbing integrin</i>
LVP	<i>lipo-viro particles</i>
ml	millilitre
MTP	métalloprotéase
ng	nanogramme
NTPase	<i>nucleoside triphosphate hydrolase</i>
NTR	<i>non translated region</i>
PC	proprotéine convertase
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGF-A	<i>platelet-derived growth factor type A</i>
pol	polymérase
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
S1P, S2P	<i>site-1/2 protease</i>
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
SR-B1	<i>scavenger receptor class B type 1</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding proteins</i>
SEL	<i>small extracellular loop</i>

TM	transmembranaire
TIMPs	inhibiteur de métalloprotéases
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHC	Virus de l'hépatite C
VHCpp	VHC pseudoparticles
VHCcc	VHC adapté à la culture cellulaire
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VSVpp	<i>vesicular stomatitis virus pseudoparticles</i>
VLDL	<i>very-low density lipoproteins</i>

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

Chapitre I : Revue bibliographique

Figure 1 – Génome du VHC	p. 7
Figure 2 – Système de réplication du virus de l'hépatite C	p. 12
Figure 3 – Modèle d'interaction du VHC avec les récepteurs et corécepteurs	p. 16
Figure 4 – Structure de CD81	p. 17
Figure 5 – Structure de SR-B1	p. 21
Figure 6 – Structure de CLDN-1	p. 22
Figure 7 – Modèle général du cycle de réplication du VHC	p. 26
Figure 8 – Les membres de la famille des proprotéines convertases	p. 28
Figure 9 – Les domaines du gène de PCSK9	p. 35
Figure 10 – Modèle du mécanisme d'action de PCSK9.....	p. 38
Figure 11 – Structure des lipoprotéines	p. 39
Figure 12 – Mutants de PCSK9 causant l'hyper- ou l'hypo- cholestérolémie	p. 41

INTRODUCTION

Le virus de l'hépatite C (VHC) est la première cause du cancer du foie en Amérique du Nord et plus de 3 % de la population mondiale est porteur chronique. Il constitue un grave problème de santé publique puisqu'il n'existe aucun vaccin pour se protéger contre ce virus et que la majorité des nouveaux cas sont diagnostiqués chez les utilisateurs de drogues injectables. Ces facteurs font que l'étude du virus de l'hépatite C a connu un grand essor dans les dernières années. Toutefois, l'étude des différentes étapes du cycle de réplication du VHC n'est pas facile pour plusieurs raisons. D'abord, les hépatocytes primaires sont difficilement infectables *in vitro*. De plus, ce n'est que récemment qu'un génome complet du VHC infectieux *in vitro* a été isolé d'un japonais souffrant d'une hépatite fulminante (JFH1). Cette découverte a rendu possible la reproduction *in vitro* du cycle complet du virus, incluant la relâche de lipo-viro-particules infectieuses dans le milieu. Ensuite, malgré la disponibilité d'un virus infectieux *in vitro*, très peu de lignées cellulaires hépatiques sont permissives. En effet, le mécanisme d'entrée du VHC demeure inexpliqué et la liste des récepteurs et corécepteurs nécessaires à la pénétration du virus est incomplète. Parmi cette liste, on retrouve le SR-B1, la CLDN 1, 6 et 9, le CD81 et le LDLR. Plusieurs études supportent la participation du LDLR dans l'entrée virale. En effet, par l'entremise du LDL et du VLDL, lipoprotéines auxquelles est associé le VHC, le LDLR aurait la capacité de lier les lipo-viro particules qui entreraient par endocytose.

La dyslipidémie est un déséquilibre des niveaux de lipides sanguins. Elle est provoquée de façon exogène par une mauvaise alimentation ou de façon endogène par des facteurs génétiques. Par exemple, des mutations dans le gène de l'apolipoprotéine B, du LDLR et de PCSK9 mènent à l'hyper- ou à l'hypo-cholestérolémie. PCSK9 est une protéine convertase soluble retrouvée dans le sang jouant un rôle majeur dans la régulation du niveau de LDLR à la surface des hépatocytes. Contrairement aux autres membres de sa famille, cette convertase ne clive aucun substrat et demeure attachée à son prodomaine. En fait, PCSK9 dirige son substrat vers les lysosomes.

Le rôle physiologique de PCSK9 de mener le LDLR à la dégradation en fait une cible évidente pour le développement d'un agent thérapeutique pour traiter la dyslipidémie. Toutefois, nous avons employé PCSK9 pour une tout autre approche. **Notre but premier était d'étudier l'impact de PCSK9 sur l'infection par le VHC en observant l'effet sur l'expression de trois des récepteurs du VHC, soit le LDLR, le CD81 et le SR-BI.**

Ce mémoire de maîtrise présente d'abord une revue de littérature survolant les connaissances générales sur le virus de l'hépatite C, particulièrement les théories sur son mécanisme d'entrée. Ensuite, nous retrouvons les principales notions sur la famille des proprotéines convertases, principalement sur la convertase PCSK9. Nous retrouvons également une version acceptée de l'article scientifique rédigé à partir des résultats obtenus de nos travaux. Enfin, une discussion complète faisant la lumière sur l'impact de nos recherches est présentée.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

Section 1 : Le virus de l'hépatite C

1.1 Généralités

Le virus de l'hépatite C (VHC) a été découvert en 1989. Il est de la famille des Flaviviridae et du genre *Hepacivirus* (Suzuki *et al.* 2007). Parmi les virus de la même famille, on retrouve le virus de la fièvre jaune, le virus du Nil occidental et le virus de la Dengue. Le virus de l'hépatite C est endémique. On estime que 170 millions de personnes sont porteurs chroniques du VHC dans le monde et que 3 à 4 millions de personnes sont infectées chaque année (Thomson et Finch 2005; Arumugaswami *et al.* 2008).

1.2 Mode de transmission

Le VHC se transmet principalement de manière parentérale. On retrouve deux groupes d'âge principaux de personnes infectées. Le premier, les personnes âgées entre 30 et 49 ans, regroupent des individus susceptibles d'avoir contracté le VHC suite à l'injection contaminée de drogue intraveineuse, facteur principal de transmission du VHC dans les pays développés. On retrouve dans le second groupe des personnes âgées. On estime que ces individus ont été infectés suite à une transplantation d'organe ou à des transfusions sanguines bien avant le criblage pour le VHC des banques de sang (Thomson et Finch 2005). Il demeure que parmi ce groupe, plusieurs individus infectés n'ont jamais reçu de transfusion ni de transplantation et dont la source de leur infection est inconnue. De plus, à l'échelle mondiale, la transmission mère-enfant est une voie importante d'infection (Indolfi *et al.* 2008).

1.3 Pathologie

Selon l'Organisation mondiale de la santé, la période d'incubation du VHC avant l'apparition des premiers symptômes cliniques varie entre 15 et 150 jours. Néanmoins, dans la majorité des cas (60 à 70%), l'infection aiguë est asymptomatique. Les symptômes les plus courants sont la fatigue et l'ictère. L'infection devient chronique chez

environ 80% des personnes infectées. Dans 20% des cas, le système immunitaire réussit à éliminer le virus (Diedrich 2006). La progression des symptômes cliniques d'une infection chronique débute par une inflammation du foie, suivi d'une fibrose qui se caractérise par des lésions tissulaires du foie. Dans un stade avancé de fibrose, le patient souffre d'une cirrhose et dans 20% des cas, développera un cancer du foie. Les lésions du foie ne seraient pas causées directement par le virus, mais par un partenariat entre le virus et le système immunitaire. En effet, les hépatocytes lysés sont remplacés par des tissus hépatiques fibreux. On estime que le développement du cancer hépatocellulaire se fait sur une période d'environ 20 ans. Le mécanisme qui conduit au cancer du foie est inconnu. L'hépatite C aggrave toute affection hépatique préexistante à laquelle elle vient s'ajouter. Ainsi, le cancer du foie progresse plus rapidement chez les sujets souffrants d'alcoolisme et atteints du VHC (Diedrich 2006). On note aussi que le VHC est une cause majeure de cryoglobulinémie. Cette affection se traduit par un désordre dans la prolifération des lymphocytes B. Misiani et al. (Misiani *et al.* 1992) ont rapporté que plus de 98% des patients souffrant de cryoglobulinémie avancé étaient infectés par le VHC.

Il n'existe aucun vaccin pour se protéger contre une infection par le VHC. Le meilleur traitement disponible est dispendieux, s'échelonne sur plusieurs mois et cause des effets secondaires sévères. Il consiste à administrer un traitement de ribavirin et d'interféron alpha 2b combiné au polyéthylène glycol (Diedrich 2006). L'efficacité du traitement varie selon le génotype, mais en Amérique du Nord où le VHC de génotype 1 prédomine, une personne sur deux élimera le virus complètement. Le traitement atteint un taux de succès entre 80 et 90% chez les patients infectés par les génotypes 2 à 6. Très peu d'options existent pour les personnes qui ne répondent pas au traitement. Des drogues qui interfèrent de façon spécifique avec la réplication ou la traduction du VHC ne sont pas encore disponibles, mais quelques candidats prometteurs sont en test clinique (McGovern *et al.* 2008).

Jusqu'à ce jour, 6 génotypes majeurs du VHC ont été identifiés et diffèrent entre eux d'environ 30% dans leur séquence d'acides aminés (Simmonds *et al.* 1993; Suzuki *et al.* 2007). On retrouve parmi ces génotypes de nombreux sous-types. Il n'existe pas

d'évidences claires que le génotype influence la progression de l'infection, mais on sait que la réponse aux traitements corrèle très bien avec le génotype (Thomson et Finch 2005).

1.3 Organisation génomique du VHC

1.3.1 Génome

Le VHC a un génome d'ARN de polarité positive et de simple brin d'une taille d'environ 9.6 kb. Son génome est organisé comme ceci : 5'NTR—C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B—3'NTR (Arumugaswami *et al.* 2008) (figure 1). La région 5' NTR longue de 341 nucléotides est une des régions les plus conservées du génome du VHC. Elle forme quatre domaines hautement structurés (domaines I-IV) contenant une structure secondaire spécifique permettant une liaison directe du génome virale sur la sous-unité (IRES) (Thomson et Finch 2005; Suzuki *et al.* 2007). Le IRES comprend presque tout le 5'NTR du génome. De plus, certaines évidences suggèrent que les premiers 12 à 30 nucléotides de la séquence codante de core seraient importants pour l'activité du IRES (Bartenschlager et Lohmann 2000). Les premiers 40 nucléotides du 5'NTR ne sont pas essentiels pour la traduction. La traduction du génome est donc dirigée par le IRES qui permet la liaison directe du ribosome à proximité du codon de départ du génome (Bartenschlager et Lohmann 2000). Par analogie avec d'autres virus à ARN avec une expression médiée par un IRES, la région 5'NTR du VHC pourrait contenir non seulement des déterminants pour la traduction, mais aussi des éléments agissant en cis pour la réplication de l'ARN virale. En effet, des études récentes ont démontré que la séquence en amont du IRES est essentielle pour la réplication virale et que le domaine II du IRES est crucial pour la réplication (Friebe *et al.* 2001). Le 3'NTR est composé d'une séquence variable suivant le codon d'arrêt du génome, d'une queue poly(UC) et d'une séquence hautement conservée de 98 nucléotides essentiels pour la réplication (Kolykhalov *et al.* 2000).

La traduction médiée par le IRES mène à une polyprotéine d'environ 3010 acides aminés qui est ensuite clivée co- et post-traductionnellement par des protéases cellulaires et

virales en 10 fragments, avec 3 protéines structurales localisées à l'extrémité N terminale suivie de 7 protéines non-structurales.

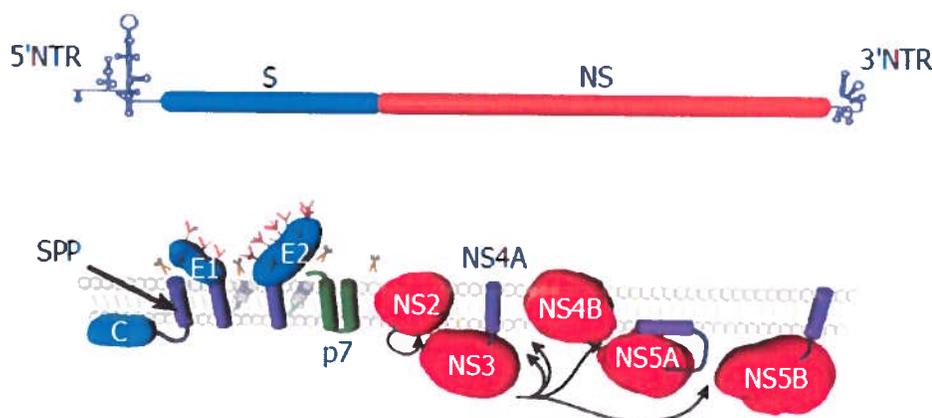


Figure 1 : **Génome du VHC** (Dubuisson 2007). Les protéines structurales (S) sont représentées en bleus (core : c; protéines d'enveloppe : E1/E2). Les protéines non-structurales (NS) sont représentées en rouges et en vert. La protéine p7 forme le canal ionique.

1.3.2 Protéines virales

Le premier produit de clivage de la polyprotéine est la protéine structurale hautement basique core (C; 21 kDa) qui est le principal constituant de la nucléocapside. Les deux autres protéines structurales sont les glycoprotéines E1 (32 kDa) et E2 (70 kDa) (Diedrich 2006; Dubuisson 2007). Les protéines E1 et E2 forment un hétérodimère non covalent à la surface virale. Ce sont des protéines membranaires de type I avec un grand ectodomaine à l'extrémité N-terminale et un domaine transmembranaire en C-terminale. Leurs ectodomains sont fortement glycosylés (Diedrich 2006). En effet, E1 et E2 possèdent respectivement 6 et 11 sites de glycosylation potentiels. On retrouve à l'intérieur de E2 trois régions hypervariables (HVR). Les résidus 384 à 410 de l'ectodomaine de E2 forment HVR1, les résidus 474 à 482 forment HVR2 et les résidus 431 à 466, HVR3 (Troesch *et al.* 2006; Dubuisson 2007; McCaffrey *et al.* 2007). La séquence de HVR2 est relativement stable entre les personnes infectées par VHC comparativement aux autres régions hypervariables (McCaffrey *et al.* 2007). Toutefois, l'accumulation de mutations dans cette région semble corrélée avec l'efficacité de la réponse au traitement interféron (Hofmann *et al.* 2003). Différentes études supportent également l'idée que les HVR jouent un rôle fonctionnel dans l'entrée virale (McCaffrey

et al. 2007). Ensemble, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 sont essentielles pour la pénétration du virus dans la cellule puisqu'ils constituent les ligands pour les récepteurs cellulaires (Dubuisson 2007).

La protéine p7 est localisée à la jonction des protéines structurales et non-structurales. C'est une petite protéine non-structurale de 63 acides aminés composée de deux domaines transmembranaires connectés par une boucle formant un pore d'un diamètre de 3 à 5 nm. p7 est décrit comme une viroporine. La fonction de ce groupe de protéines est de former des canaux ioniques pour assurer l'assemblage et/ou la relâche des virions. En effet, p7 est capable de former un canal pour cation dans des membranes lipidiques artificielles à un pH physiologique. Un des rôles possibles de p7 est de permettre le transport des ions du RE au cytoplasme dans les cellules hôtes infectées. Il demeure que p7 n'est pas essentiel à la réplication de l'ARN virale (Perez-Berna *et al.* 2008). Toutefois, Sakai *et al.* ont démontré que p7 est essentiel à l'infectivité du VHC chez le chimpanzé (Sakai *et al.* 2003) et Steinmann *et al.* ont récemment suggéré que p7 est crucial à l'assemblage et à la relâche des virions (Steinmann *et al.* 2007).

Les autres protéines non-structurales sont NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B et elles sont nécessaires à la réplication virale. La protéine NS2 (21 kDa) n'est pas essentielle à la formation du complexe de réplication et sa fonction sous sa forme mature est encore inconnue. Toutefois, sous sa forme immature, NS2 participe à l'activité protéase responsable du clivage à la jonction NS2/NS3. Les premiers 180 résidus de NS3 sont également requis pour ce clivage. En effet, NS3 (69 kDa) est une protéine multifonctionnelle avec en N-terminal un domaine sérine protéase et en C-terminal, un domaine hélicase et NTPase. L'activité protéase de NS3 est augmentée par son cofacteur NS4A. La protéine NS4A (6 kDa) est une protéine membranaire nécessaire au clivage de la polyprotéine. Il semble aussi que NS4A soit requis pour stabiliser la protéase contre toute dégradation protéolytique. Ensemble, NS3 et NS4A sont responsables du clivage de la polyprotéine en aval de NS3 et l'activité protéase qu'ils assurent est essentielle à la génération des constituants du complexe de réplication (Dubuisson 2007). La protéine NS4B (27 kDa) est hautement hydrophobe et composée de quatre domaines

transmembranaires. Récemment, il a été démontré que NS4B est palmitolé dans sa région C-terminale. La protéine NS4B est détectée en association avec la membrane du RE. De plus, il a été proposé que NS4B a comme fonction d'induire la formation de structures membranaires responsable de supporter la réplication de l'ARN virale (Dubuisson 2007). La protéine NS5A (57 kDa) contient une hélice-alpha dans sa région N-terminale qui sert d'ancrage membranaire. C'est une protéine essentielle à la réplication de génome. En effet, des mutations qui favorisent la réplication de l'ARN en culture cellulaire sont majoritairement retrouvées dans la séquence codant pour NS5A. De plus, NS5A semble avoir un rôle dans la modulation de la réponse à l'interféron (Dubuisson 2007). La protéine NS5B (68 kDa) est une polymérase et catalyse la synthèse de l'ARN viral (Diedrich 2006; Dubuisson 2007). C'est une protéine dont la région C-terminale est transmembranaire. Comme la majorité des protéines du VHC, NS5B est détecté en association avec la membrane du RE. La protéine NS5B peut initier la synthèse d'ARN *de novo* (sans amorce), du moins *in vitro*, et il est également assumé que l'initiation *de novo* se fait aussi *in vivo*. La structure cristallographique de NS5B ressemble à celle des autres polymérases avec une paume, des doigts et un pouce. Le domaine paume contient le site actif de l'enzyme tandis que les doigts et le pouce modulent l'interaction avec l'ARN (Dubuisson 2007).

1.4 Système de réplication et d'infection

Plus de 15 ans après l'identification du VHC, les découvertes sur sa réplication ne font que commencer. En effet, ce n'est qu'en 1997 que l'équipe de Rice découvre que l'ADNc originalement identifié du VHC manquait un fragment hautement conservé à l'extrémité 3' (Kolykhalov *et al.* 1996). C'est à ce moment que les véritables avancées ont débuté puisqu'un ADNc complet et fonctionnel était disponible. Toutefois, aucun système de réplication *in vitro* n'était existant et l'infectivité des transcrits de ces ARN était étudiée par l'inoculation de chimpanzés (Kolykhalov *et al.* 1997). En 1999, Lohmann *et al.* conçoit un système de réplicon sous-génomique de génotype 1b (l'isolat Con1). Ce réplicon consiste en un ARN bicistronique dont le premier cistron contient le 5' NTR responsable de la traduction du gène de sélection pour le G418 et le deuxième cistron, le IRES du virus ECMV qui dirige la traduction des gènes NS3 à NS5B du VHC (Figure 2).

Ce réplicon était capable d'établir une réplication persistante dans la lignée de cellules hépatiques humaines Huh7 (Lohmann *et al.* 1999). Toutefois, l'utilisation de ce système était limitée due à la difficulté à initier la réplication. Par la suite, Blight *et al.* (2002) ont traité les cellules Huh7 supportant la réplication continue du réplicon avec de l'interféron alpha et ils ont isolé une nouvelle lignée cellulaire défectueuse dans le gène RIG. Ces cellules désignées Huh7.5 étaient plus permissives à la réplication de l'ARN de VHC (Blight *et al.* 2002). Le séquençage de l'ARN viral contenu dans Huh7.5 a permis d'identifier des mutations adaptatives dans les protéines non-structurales qui augmentent dramatiquement la réplication virale (Blight *et al.* 2000; Bartenschlager *et al.* 2004). Le premier ADNc du VHC de génotype 1a a été obtenue par deux équipes (Kolykhalov *et al.* 1997; Yanagi *et al.* 1997). Le génome du VHC nommé H77 a été cloné à partir du sérum d'un patient infecté. Pour ce faire, la séquence complète de différents clones ont été alignées et une séquence consensus a été établie et générée. C'est de cette façon qu'un réplicon exprimant le génome complet du VHC (*full length*) (H77) capable de se répliquer en culture cellulaire a été identifié (Blight *et al.* 2003). De plus, l'ARN transcrit est capable d'infecter les chimpanzés lorsqu'innoculé de manière intrahépatique. D'autres ADNc "*full length*" du VHC ont été établie, mais aucun de ces clones n'ont été adaptés à la culture cellulaire et tous se répliquent faiblement. Toutefois, malgré la réplication de l'ARN virale du réplicon H77, aucune particule infectieuse n'est produite (Ikeda *et al.* 2002).

Une avancée majeure dans l'étude du cycle de réplication complet du VHC a été la génération d'un pseudotype rétroviral exprimant les glycoprotéines E1/E2 du VHC non modifiées (VHC pseudoparticules) (Bartosch *et al.* 2003; Hsu *et al.* 2003). Les VHCpp sont produites par la cotransfection des cellules 293T avec des vecteurs d'expression codant pour (i) VHC E1/E2 (ii) les protéines Gal-Pol du VIH et (iii) un génome rétroviral encodant une protéine rapporteuse pour détecter le virus, par exemple la luciférase (figure 2). Ce système a permis d'étudier le mécanisme d'entrée du virus d'une façon qui se rapproche à celle qu'utilisent les virions *in vivo* (Tellinghuisen *et al.* 2007). Toutefois, les pseudoparticules recueillies dans le surnageant des cellules 293T transfectées sont dépourvues de lipides à leur surface (Diedrich 2006). Cette déprivation de lipides limite

leur interaction avec le LDLR à la surface cellulaire des hépatocytes et compromet l'efficacité de l'infection.

Récemment, Date *et al.* et Kato *et al.* ont identifié un isolat de génotype 2a du VHC appelé JFH-1 (Kato *et al.* 2003; Date *et al.* 2004). Ce virus a été isolé d'un patient japonais souffrant d'une rare hépatite fulminante. L'ARN viral de l'isolat JFH1 peut se répliquer non seulement dans les cellules Huh7, mais également dans les lignées hépatiques HepG2, IMY-N9 et les lignées cellulaires non hépatiques HeLa et 293 et ce, sans la nécessité de mutations adaptatives (Date *et al.* 2004). La transfection de l'ARN complet de JFH-1 dans les cellules Huh7 mène à la production de particules virales capables d'infecter des cellules naïves (Wakita *et al.* 2005). Ces particules virales sont infectieuses chez les chimpanzés et chez les souris alb-uPA-SCID transplantées avec des hépatocytes humains. Les virus recueillis dans le sang de ces animaux demeurent infectieux en culture cellulaire (Wakita *et al.* 2005; Lindenbach *et al.* 2006). Depuis sa découverte, les nouveaux systèmes d'infection dérivent principalement de JFH-1. Par exemple, on l'utilise pour la construction de chimères qui sont composées des gènes codant pour les protéines non structurales de JFH1 jumelées aux gènes des protéines structurales d'un autre isolat (Lindenbach *et al.* 2005). Le VHC de type JFH-1 est un outil indispensable pour comprendre le cycle de vie du VHC puisqu'il permet l'étude de chaque étape de l'infection.

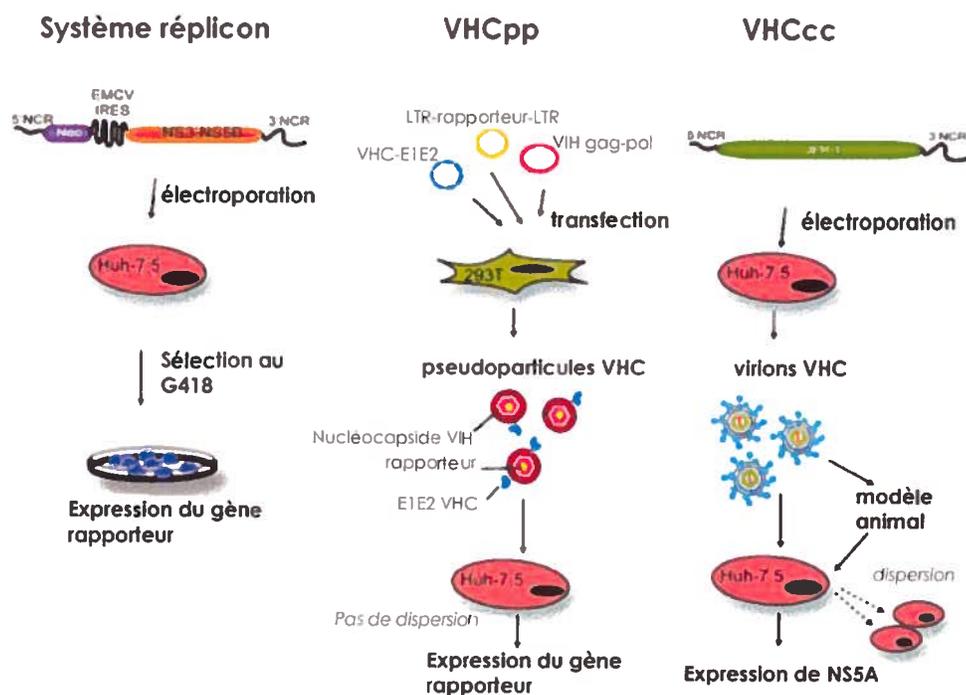


Figure 2 : **Système de réplicon** (Tellinghuisen *et al.* 2007) (Lavie *et al.* 2007). Dans le système VHCpp, le titre viral est quantifié par l'intensité de l'expression du gène rapporteur, par exemple la luciférase. Dans le système VHCcc, le titre viral est quantifié par la mesure de l'expression de la protéine NS5A, par exemple, par immunobuvardage de type Western.

1.5 Propriétés physicochimiques du VHC

Très peu est connu sur la structure et la morphogénèse du VHC. Des études par microscopie électronique ont permis d'observer dans le sérum de patients infectés des virions de tailles variables, allant de 20 à 100 nm, et des virions circulant enveloppés ou non-enveloppés (Diedrich 2006). Les quelques virions ont été visualisés à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines structurales et d'anticorps secondaires couplés à des billes d'or. L'observation de virions par microscopie électronique reste très difficile.

La caractérisation du VHC produit *in vitro* a connu une percée majeure lors du développement du système de réplicon. Bien que le réplicon soit incapable de produire des particules infectieuses, ce système a permis d'approfondir les connaissances sur les facteurs cellulaires impliqués dans la réplication virale. C'est à ce moment qu'on a alors

proposé l'implication du métabolisme des lipides de l'hôte dans la réplication du virus. Par exemple, Gosert *et al.* ont montré que le complexe de réplication du VHC se retrouve dans un réseau membranaire qui contient des radeaux lipidiques de faible densité ($\leq 1,10$ g/ml) (El-Hage et Luo 2003; Gosert *et al.* 2003). Huang *et al.* (2007) ont démontré plus tard que plus de 30% des protéines associées au complexe de réplication sont impliquées dans le métabolisme des lipides (Huang *et al.* 2007). Enfin, une autre étude a démontré que la réplication de l'ARN virale est augmentée dans les cellules Huh7 quand le milieu de culture est supplémenté en acide gras monoinsaturé et diminuée en présence d'acide gras polyinsaturé (Nielsen *et al.* 2008).

Le second grand avancement dans la caractérisation du VHC s'est fait suite à l'identification de la souche JFH-1 (Kato *et al.* 2001). Ce virus se réplique et produit des particules infectieuses qui sont relâchées dans le milieu. Gastaminza *et al.* (2006) ont étudié la densité des virions recueillis dans le surnageant de culture (Gastaminza *et al.* 2006). Ils ont observé que la densité des virus produits par la souche JFH-1 se situe entre 1,03 g/ml et 1,16 g/ml. Cette variabilité de densité est due à l'association, ou non, des virions avec différentes composantes du milieu. On retrouve de l'ARN viral dans les fractions contenant les lipoprotéines de très faible densité (VLDL; densité entre 0,95 et 1,006 g/ml), les lipoprotéines de faible densité (LDL, densité entre 1,006 et 1,063 g/ml), les lipoprotéines de forte densité (HDL, densité entre 1,063 et 1,21 g/ml) et les fractions dépourvues de lipoprotéines (Wakita *et al.* 2005; Diedrich 2006). Bradley et Hijikata ont analysé la corrélation entre la densité des virions et l'infectivité *in vivo* (Bradley *et al.* 1991; Hijikata *et al.* 1993). Bradley *et al.* ont séparé le sérum infectieux humain en cinq fractions de densité différentes. Ils ont injecté à des chimpanzés les virus provenant de chacune des fractions et déterminé le titre infectieux des différentes fractions. Étonnamment, ils ont observé que les virions les plus infectieux se retrouvaient dans la fraction de faible densité, soit sous la barre des 1,10 g/ml (Bradley *et al.* 1991; Gastaminza *et al.* 2006; Chang *et al.* 2007). Cette observation a par la suite permis de suggérer que ces virions étaient associés à des lipoprotéines de type VLDL/LDL. Les résultats de Bradley *et al.* ont par la suite été confirmés par une étude réalisée par Hijikata *et al.* Ils ont eux séparé par densité le sérum humain d'un titre infectieux connu et

déterminé la distribution de l'ARN viral par RT-PCR. Selon cette étude, l'ARN viral du sérum fortement infectieux se retrouve majoritairement dans la fraction de faible densité (< 1,06 g/ml) tandis que l'ARN viral du sérum le moins infectieux se retrouve dans la fraction de forte densité (1,17 g/ml) (Hijikata *et al.* 1993; Nielsen *et al.* 2006). Il est maintenant acquis que les virus les plus infectieux sont associés avec des lipoprotéines de type VLDL/LDL et que les virus libres, non-associés aux lipoprotéines sont faiblement ou non infectieux. Toutefois, les composantes virales permettant la liaison au LDL et au VLDL sont encore inconnues. Les essais pour détecter l'interaction directe de LDL/VLDL avec la protéine core, l'ectodomaine de E2, l'hétérodimère E1/E2 n'ont fourni aucune conclusion (Monazahian *et al.* 2000; Wunschmann *et al.* 2000; Lambot *et al.* 2002). Il est cependant connu que le VHC est sécrété dans le milieu déjà lié aux lipides. Le virus de l'hépatite C peut aussi se lier avec des immunoglobulines et/ou des exosomes affectant ainsi le profil de densité des particules virales (Thomssen *et al.* 1993; Andre *et al.* 2002; Kono *et al.* 2003; Masciopinto *et al.* 2004). En effet, des complexes immuns contenant VHC, IgG et IgM sont couramment observés dans le sang et entre 50 et 80% des individus atteints de cryoglobulinémie mixte souffrent d'une infection chronique du VHC (Agnello *et al.* 1992; Sansonno *et al.* 1996; Lunel et Musset 1998). La cryoglobulinémie mixte est caractérisée par la formation anormale de complexes de différentes protéines sanguines, principalement IgM. Cette affection est clairement associée à une infection par le VHC (Thomson et Finch 2005).

Chez les patients chroniquement infectés, le VHC circule donc dans le sang en association entre autres avec des lipoprotéines et on nomme ces particules LVP (lipoviro-particules) (Andre *et al.* 2002; Martin *et al.* 2008). Le profil de densité des particules virales dépend du stade de l'infection durant lequel l'échantillon a été prélevé, mais les LVP sont prédominants tôt dans l'infection. De plus, la proportion de LVP en circulation diffère entre les patients pour des raisons encore inexplicables, mais le génotype du virus pourrait jouer un rôle dans la répartition des lipides sur les virions (Kanto *et al.* 1995; Zahn et Allain 2005).

1.6 Entrée et récepteurs cellulaires

La première étape dans le cycle de vie d'un virus est l'attachement de la particule infectieuse à la cellule hôte par une interaction spécifique entre le récepteur à la surface cellulaire et une protéine d'attachement à la surface du virus. L'étude de l'entrée du virus de l'hépatite C a débuté avec le développement des pseudoparticules. Rappelons que ce système consiste en un pseudovirus exprimant les glycoprotéines E1 et E2 du VHC. On s'est aperçu que seules les lignées cellulaires dérivées des cellules du foie humain pouvaient être infectées (Bartosch *et al.* 2003; Hsu *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2004). À ce jour, les raisons précises de ce tropisme sont inconnues, mais différents facteurs cellulaires ont été suggérés comme récepteurs et/ou corécepteurs potentiels à l'entrée du virus dans les hépatocytes. Parmi ceux-ci on retrouve le récepteur du LDL (LDLR) (Agnello *et al.* 1999; Monazahian *et al.* 1999; Wunschmann *et al.* 2000), le scavenger récepteur B1 (SR-B1) (Scarselli *et al.* 2002), les claudins 1, 6 et 9 (Evans *et al.* 2007; Meertens *et al.* 2008), les asialoglycoprotéines (ASGPR) (Saunier *et al.* 2003), les glycosaminoglycans (GAG) L-SIGN et DC-SIGN (Gardner *et al.* 2003; Pohlmann *et al.* 2003), l'heparan sulphate (Barth *et al.* 2003; Koutsoudakis *et al.* 2006) et le CD81 (Drummer *et al.* 2005; Cocquerel *et al.* 2006) (figure 3). Diedrich, G a groupé les récepteurs potentiellement impliqués dans l'entrée virale en trois catégories selon la nature de leur interaction avec le VHC (i) CD81 se lie directement aux acides aminés de la protéine de l'enveloppe E2; (ii) L-SIGN, DC-SIGN et ASGPR se lient aux résidus de carbones de E1 et E2; (iii) le LDLR n'interagit probablement pas avec aucune composante virale, mais se lie aux lipoprotéines associées au virus. Pour sa part, SR-B1 pourrait jouer un double rôle, c'est-à-dire se lier directement à E2 et/ou aux lipoprotéines (Diedrich 2006).

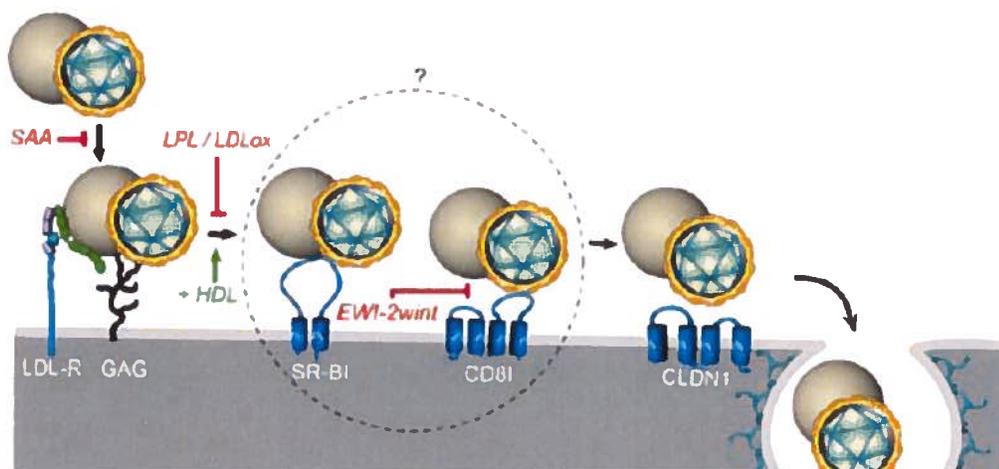


Figure 3 : Récepteurs et corécepteurs impliqués dans l'entrée du VHC dans les hépatocytes (Helle et Dubuisson 2008). Les inhibiteurs de l'attachement du VHC aux récepteurs sont représentés en rouges.

1.6.1 CD81

Pileri et al. ont été les premiers à identifier CD81 comme protéine cellulaire capable de lier E2s, une forme tronquée soluble de la glycoprotéine E2 du VHC (Pileri *et al.* 1998; Drummer *et al.* 2002; Drummer *et al.* 2005). Le rôle de CD81 est de permettre l'attachement du VHC à la cellule. Sa présence à la surface cellulaire est indispensable. Toutefois, l'efficacité de l'infection dépend de la présence d'autres récepteurs. Le CD81 est une protéine de 26 kDa faisant partie de la famille des tétraspanines (Flint *et al.* 1999; Cocquerel *et al.* 2006). Il est exprimé dans la majorité des tissus humains à l'exception des globules rouges et des plaquettes et son niveau d'expression varie selon la lignée cellulaire et durant sa différenciation (Higginbottom *et al.* 2000). C'est une protéine membranaire composée de quatre domaines transmembranaires (TM) et deux domaines extracellulaires (EC); une " *small extracellular loop* " (SEL) et une " *large extracellular loop* " (LEL) (figure 4) (Levy *et al.* 1998). La LEL est suffisante pour permettre la liaison à E2. Higginbottom *et al.* ont identifié que la phénylalanine 186 (F186) est un acide aminé de CD81 critique dans la liaison à E2 (Higginbottom *et al.* 2000).

Il existe plusieurs évidences du rôle déterminant de CD81 dans l'entrée virale. Les travaux de Zhang *et al.* suggèrent que CD81 est essentiel à l'infectivité du VHC. Pour

arriver à cette conclusion, ils ont transfecté CD81 dans les cellules hépatiques humaines HepG2. La particularité des cellules HepG2 est qu'elle n'expriment pas CD81 à leur surface et par conséquent ne sont pas infectables par le VHC. Ils ont démontré que la transfection de CD81 dans les cellules HepG2 permet l'infection par les VHCpp et les VHCcc (Zhang *et al.* 2004; Lindenbach *et al.* 2005). Ensuite, cette même équipe a démontré par siARN que la perte d'expression de CD81 résulte en une perte de susceptibilité des cellules hépatiques normalement infectables. Une diminution de 70% de l'expression de CD81 est suffisante à l'inhibition complète de l'infection (Zhang *et al.* 2004). Plusieurs études ont aussi démontré que des anticorps contre CD81 ou la forme soluble de CD81, empêchent l'infection par les VHCpp et les VHCcc d'une façon dose-dépendante (Bartosch *et al.* 2003; Wakita *et al.* 2005; Bertaux et Dragic 2006; Zhong *et al.* 2006).

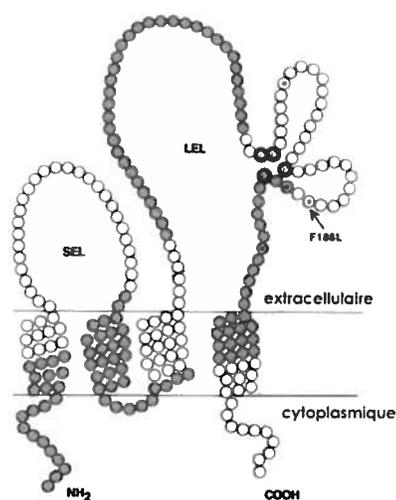


Figure 4 : **Structure de CD81** (Higginbottom *et al.* 2000)

La nécessité de la présence de CD81 pour l'infection est conservée chez tous les génotypes du VHC. McKeating *et al.* ont toutefois identifié de légères différences dans les résidus du CD81 interagissant avec la protéine E2 chez les différents génotypes, menant à des modulations dans l'infection (McKeating *et al.* 2004). Ensemble, ces résultats soutiennent et confirment le rôle essentiel de CD81 dans l'infectivité du VHC. Toutefois, l'expression de CD81 est insuffisante pour l'infection puisque son expression dans des cellules non hépatiques ne permet pas l'entrée des VHCpp (Bartosch *et al.* 2003; Hsu *et al.* 2003). Aussi, la distribution de CD81 *quasi* ubiquitaire n'explique pas le

tropisme hépatique du VHC. D'autres cofacteurs semblent être nécessaires à la pénétration du virus.

Les membres de la famille des tétraspanines ont la capacité d'interagir entre eux et avec d'autres protéines membranaires pour former le " *tetraspanins web* ". Les principaux partenaires complexés avec CD81 sont EWI-F et EWI-2 (Stipp *et al.* 2001; Charrin *et al.* 2003). Les membres de cette famille ont en commun un motif EW1 et leur ectodomaine est formé de quatre domaines d'immunoglobulines. Récemment, Rocha-Perugini *et al.* ont identifié un produit de clivage de EWI-2, appelé EWI-2wint, lequel est dépourvu du premier domaine d'immunoglobuline. Ils ont démontré que EWI-2wint est un partenaire de CD81 et inhibe l'entrée de VHCcc dans les cellules Huh7. En effet, l'expression ectopique de EWI-2wint dans des cellules permissives inhibe l'interaction entre E2 et CD81 et empêche ainsi la pénétration de VHCpp et VHCcc. EWI-2wint n'est pas exprimé dans les hépatocytes. C'est une hypothèse qui peut expliquer le tropisme hépatique du VHC puisqu'une protéine inhibitrice serait inexistante chez les hépatocytes (Rocha-Perugini *et al.* 2008).

1.6.2 LDLR

Les cellules de mammifères captent à partir du milieu extracellulaire des particules de lipoprotéines comme le LDL parce qu'elles ont un besoin continu de fournir des phospholipides et du cholestérol à leur membrane plasmique. Les particules de LDL se lient au LDLR présent à la surface membranaire et sont internalisées par endocytose. Comme le VHC dans le sérum est reconnu pour être associé avec le LDL et le VLDL, il a été suggéré qu'il profiterait de ce partenariat pour pénétrer la cellule par l'entremise du LDLR (Thomssen *et al.* 1992; Agnello *et al.* 1999; Monazahian *et al.* 1999; Wunschmann *et al.* 2000). Agnello *et al.* ont été parmi les premiers à analyser si l'endocytose du VHC était médiée par le LDLR. En utilisant l'hybridation *in situ* pour déterminer les cellules positives en ARN du VHC, ils ont fait une corrélation directe entre le niveau de LDLR à la surface cellulaire et la quantité de cellules positives (Agnello *et al.* 1999). Aussi, Monazahian *et al.* ont trouvé que le VHC ne se lie pas aux cellules de reins de singe (COS-7) sauf si elles ont été préalablement transfectées avec le

gène du LDLR (Monazahian *et al.* 1999). Germi *et al.* ont démontré que l'utilisation d'un anticorps contre le LDLR en culture cellulaire inhibe d'au moins 60% la liaison et/ou l'internalisation du VHC d'un sérum infecté (Germi *et al.* 2002). Cette étude a eu beaucoup d'impact puisqu'elle reflétait l'infection *in vivo*. À cette époque, il existait toutefois des contradictions sur le rôle du LDLR lors de l'infection. Hsu *et al.* ont démontré qu'un anticorps contre le LDLR n'inhibait pas l'infection par les VHCpp. Plus tard, ils ont démontré qu'un anticorps contre l'apolipoprotéine E (apoE), composante du VLDL, neutralisait l'infection de VHCpp d'environ 50% (Hsu *et al.* 2003). Cette neutralisation semblait être spécifique puisque l'infection d'un virus contrôle, le VSVpp, n'était pas affectée. Toutefois, Bartosh *et al.* ont démenti ces résultats en démontrant par sédimentation sur gradient de sucrose que les VHCpp et les VSVpp n'étaient ni l'un ni l'autre associé à des lipoprotéines et donc qu'un anticorps contre apoE ne devrait pas affecter l'infectivité des virus pseudotypes (Bartosch *et al.* 2003). Ensuite, Andreo *et al.* ont montré une inhibition du VHCcc par l'ajout d'un anticorps contre l'apolipoprotéine B (apoB), composante du LDL (Andreo *et al.* 2007). Ensemble, ces résultats sont en faveur d'un rôle du LDLR dans l'infectivité du VHC *in vivo*.

Récemment, une corrélation entre le niveau de LDLR à la surface cellulaire et le titre viral *in vivo* a été réalisée par Petit *et al.* (Petit *et al.* 2007). Ils ont étudié le profil lipidique du sang chez plusieurs patients infectés de façon chronique et ils ont montré une association significative entre l'expression du LDLR, du LDL et du titre viral. La quantité de LDLR était proportionnelle au titre viral tandis que l'âge, le sexe ou le génotype n'était pas corrélé. De plus, Dai *et al.* ont eux démontré dans une grande étude chez l'humain, que l'infection par le VHC est associée à un faible niveau de cholestérol (Dai *et al.* 2008). Ces études réalisées chez l'humain renforcent l'idée que le LDLR est un récepteur important dans l'infectivité du VHC.

1.6.3 SR-B1

SR-BI est exprimé dans le foie, le placenta, le petit intestin et les macrophages. C'est une protéine de 509 acides aminés composée de deux courts domaines cytoplasmiques, de deux passages transmembranaires et d'une grande boucle extracellulaire (Figure 5)

(Calvo et Vega 1993; Rhainds et Brissette 2004). C'est un récepteur à multiples ligands qui lie une variété de lipoprotéines incluant le HDL, le LDL et le VLDL ainsi que d'autres types de protéines. Comme dans le cas de CD81, le *scavenger receptor* classe B de type I (SR-BI) a été proposé comme candidat potentiel à l'entrée du virus suite à des études basées sa capacité à se lier à E2s (Scarselli *et al.* 2002). Il n'y a aucune évidence claire que SR-BI se lie à l'hétérodimère E1/E2. Quelques études sont toutefois en faveur de l'implication de SR-BI dans l'entrée du virus (i) Grove *et al.* ont récemment démontré que le niveau d'expression de SR-BI dans les cellules Huh7.5 module le niveau d'infection du VHC (Grove *et al.* 2007) (ii) des anticorps ainsi que des ARNi dirigés contre SR-BI inhibe l'infection par le VHCpp, mais de façon moins évidente que CD81. Une diminution de 90% de l'expression de SR-BI cause entre 30% et 90% d'inhibition de l'infection par le VHCpp, dépendamment du génotype (Lavillette *et al.* 2005) (iii) la transfection de cellules 293 avec SR-BI augmente de 20 fois leur susceptibilité à l'infection par le VHCpp (Bartosch *et al.* 2003). De plus, les deux ligands naturels de SR-BI modulent l'infektivité de deux façons différentes. D'abord, le HDL augmente modérément l'infektivité des VHCpp tandis que les LDL sont des inhibiteurs de l'entrée de VHCcc et de VHCpp (Bartosch *et al.* 2005; Voisset *et al.* 2005; von Hahn *et al.* 2006). Différentes études suggèrent que la région HVR1 de E2 est critique à l'attachement à SR-BI. La délétion de HVR1 abolit l'effet positif de HDL sur l'infection (Bartosch *et al.* 2005; Callens *et al.* 2005; Voisset *et al.* 2005). Il demeure que la coexpression de CD81 et de SR-BI est insuffisante pour conférer la susceptibilité à VHCpp ou à VHCcc.

Le rôle exact de SR-BI dans l'infection n'est pas clair. Des études récentes suggèrent une interaction directe avec les structures virales, mais il a également été proposé que le SR-BI s'associerait aux lipoprotéines du virus (Charrin *et al.* 2003; Maillard *et al.* 2006; Evans *et al.* 2007). Une étude par Zeizel *et al.* démontre également que le SR-BI participerait à l'entrée du virus en concomitance avec CD81 (Zeisel *et al.* 2007). Un premier contact avec SR-BI pourrait être nécessaire avant l'engagement du CD81. Kapadia *et al.* ont récemment ajouté un élément important à l'entrée virale. En effet, ils ont déterminé que le niveau de cholestérol membranaire est important pour maximiser

l'efficacité de la pénétration du virus dans la cellule et assurer la coopérativité entre CD81 et SR-BI (Kapadia *et al.* 2007).

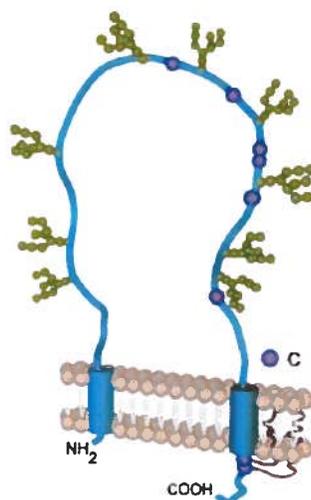


Figure 5 : **Structure de SR-B1** (Cocquerel *et al.* 2006). SR-B1 est une protéine de 509 acides aminés possédant deux domaines transmembranaires. Elle possède une seule boucle extracellulaire contenant neuf sites potentiels de N-glycosilation (vert) et six cystéines (C).

1.6.4 Claudin 1, 6, 9

Très récemment, Evans *et al.* ont identifié une nouvelle molécule, la Claudin-1 (CLDN-1), comme un facteur additionnel requis pour l'entrée du virus. Pour la première fois, on identifiait une protéine (la CLDN-1) qui lorsque surexprimée dans certains types de cellules non-hépatiques exprimant CD81, rendait la cellule infectable par le VHCpp (Evans *et al.* 2007). La CLDN-1 est un des 24 membres de la famille des claudins qui sont des protéines de jonctions cellulaires. La CLDN-1 possède trois domaines intracellulaires, deux domaines ectopiques et quatre passages transmembranaires (figure 6) (Van Itallie et Anderson 2006). Une faible réduction de l'expression de la CLDN-1 est suffisante pour contrer la répllication du VHC dans les hépatocytes normalement susceptibles aux VHCcc et aux VHCpp (Meertens *et al.* 2008). Meerteens *et al.* ont par la suite suggéré que la Claudin-6 et -9 sont aussi des cofacteurs de l'entrée du VHC dans les cellules endothéliales humaines positives pour CD81, mais elles seraient moins importantes que la CLDN-1. De plus, l'implication des claudins aurait lieu tardivement dans le processus d'entrée, bien après l'interaction avec le SR-BI et le CD81 (Evans *et al.*

2007). La CLDN-1 semble être en partie responsable du tropisme hépatique du VHC puisqu'elle est fortement exprimée dans le foie (Yang *et al.* 2008). Toutefois, certaines lignées cellulaires humaines demeurent résistantes à l'infection même en présence de CD81, de SR-BI et de CLDN-1. Ceci suggère l'existence d'autres cofacteurs non découverts ou d'un facteur inhibiteur chez ces cellules.

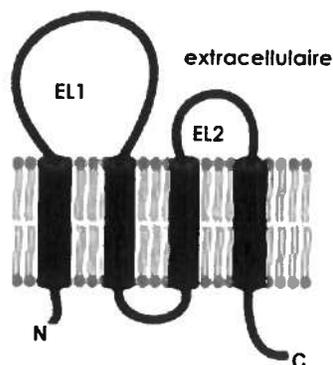


Figure 6 : **Structure de la Cldn-1** (Evans *et al.* 2007). La protéine CLDN-1 est composée de trois domaines intracellulaires, de quatre domaines transmembranaires et de deux boucles extracellulaires (EL1 et EL2).

1.6.5 GAG, lectines (L-SIGN et DC-SIGN) et ASGPR

Les glycosaminoglycans (GAG) sont présents à la surface des cellules et sont des récepteurs pour plusieurs virus incluant les virus de la famille des Flaviviridae. Il existe différents types de GAG, mais seul l'héparan sulfate semble être impliqué dans l'entrée du VHC. Des évidences existent sur l'affinité de l'héparan sulfate avec E2, mais pas avec E1/E2 (Barth *et al.* 2003). Plusieurs études ont démontré que la dégradation de l'héparan sulfate de la surface cellulaire par des enzymes inhibe l'attachement à la cellule cible (Germi *et al.* 2002; Basu *et al.* 2007; Morikawa *et al.* 2007). Il est impossible pour l'instant d'exclure que l'interaction de l'héparan sulfate avec le virus se produise par l'entremise des lipoprotéines. Dans ce sens, une étude récente a montré que les lipoprotéines de type lipases jouent un rôle indirect sur l'interaction entre les GAG et le VHC (Andreo *et al.* 2007).

L-SIGN et DC-SIGN sont des lectines de type C. L-SIGN et DC-SIGN peuvent interagir avec E2 recombinant et avec les VHCpp. La liaison du VHC à ces molécules se fait par l'entremise des carbohydrates de E1 et de E2. L-SIGN et DC-SIGN ne sont pas exprimées sur les hépatocytes; L-SIGN est fortement exprimée sur les cellules

endothéliales des sinusoides du foie tandis que DC-SIGN est exprimé principalement sur les cellules dendritiques. Il est alors peu probable que l'interaction entre le VHC et ces lectines soit directe, mais il demeure que les cellules endothéliales et dendritiques du foie sont adjacentes aux hépatocytes. On croit que le rôle de ces lectines est de capturer et de transférer les particules virales aux hépatocytes (Diedrich 2006).

Les ASPGR peuvent interagir avec la protéine E2 recombinante produite dans les cellules d'insectes. Les ASPGR sont retrouvés sur les cellules du foie. Leurs implications dans l'entrée virale reste à déterminer puisqu'il n'existe aucune preuve qu'ils peuvent lier les protéines de l'enveloppe des hépatocytes humains ou les lipoprotéines (Diedrich 2006).

1.7 Attachement et fusion

Le VHC s'attache à la surface cellulaire par la protéine de l'enveloppe E2. Des études récentes ont permis de mieux définir les premières étapes de l'entrée. Il existe une hypothèse selon laquelle les différentes formes de particules virales utiliseraient différents mécanismes pour pénétrer dans la cellule (Diedrich 2006). Il semblerait que le virus non associé à des lipoprotéines interagirait d'abord avec les GAG et le CD81 suivis d'une interaction avec la CLDN-1. Des études utilisant des anticorps contre la CLDN-1 indiquent que la CLDN-1 participe après la liaison du VHC au CD81, mais avant la fusion des membranes (Evans *et al.* 2007). Le virus associé à des lipoprotéines est la forme la plus infectieuse. Il a été proposé que l'interaction se fasse en premier lieu entre les lipoprotéines présentes à la surface du virus et le LDLR (Molina *et al.* 2007). Ensuite, la particule virale serait transférée à CD81 et/ou à SR-BI et enfin à la CLDN-1 afin d'initier la fusion. Le SR-B1 jouerait lui un double rôle en se liant soit à E2, soit aux lipoprotéines participant ainsi à l'entrée de toutes formes confondues de particules virales. Il est clair que le VHC est un virus hétérogène et il est encore impossible d'exclure que plus d'un mécanisme d'entrée existe (Diedrich 2006).

La clathrine est essentielle à l'entrée du virus dans les hépatocytes (Bertaux et Dragic 2006; Codran *et al.* 2006; Meertens *et al.* 2006). Aussi, l'entrée des VHCpp et des VHCcc se fait par la voie endosomale et la fusion de la membrane virale à la vésicule

endosomale est déclenchée par l'acidification du milieu (Hsu *et al.* 2003; Tscherne *et al.* 2006).

1.8 Réplication, assemblage et bourgeonnement

Comme mentionné précédemment, une fois à l'intérieur d'une cellule hôte permissive à la réplication du VHC, l'ARN du VHC est directement traduit à partir d'un seul cadre de lecture ouvert et génère une seule polyprotéine. La polyprotéine, constituée des protéines structurales en N-terminal et des protéines non-structurales en C-terminal, est clivée co- et post-traductionnellement par des protéases cellulaires et virales. La réplication du VHC est entièrement cytoplasmique (figure 7). Plusieurs observations indiquent que l'infection par le VHC induit une stéatose hépatique, affection caractérisée par la formation de triglycérides dans un hépatocyte (Perlemuter *et al.* 2002). La stéatose hépatique mène aussi à l'inflammation et à la fibrose du foie. Ces données indiquent que le VHC induit la stéatose et/ou que la stéatose affecte la progression des symptômes de l'infection. La protéine core du VHC, produit du clivage de la polyprotéine, est connue pour contribuer à cette stéatose. Certaines études suggèrent que la protéine core induirait la stéatose en inhibant l'activité de la protéine MTP (*microsomal triglyceridetransfer protein*), en inhibant la sécrétion des VLDL et en inhibant l'activité transcriptionnelle de PPAR α (Day et James 1998; Perlemuter *et al.* 2002; Dharancy *et al.* 2005). La protéine core semble donc jouer un rôle important dans le profil lipidique de la cellule hôte ce qui est en son avantage. En effet, la protéine core a été visualisée sur les gouttelettes de lipide (*lipid droplet* (LD)). Les LD sont des organelles qui ont pour rôle d'emmagasiner les lipides neutres et circulent dans le sang afin d'interagir avec d'autres organelles dont le RE (Miyanari *et al.* 2007). Il a été suggéré que l'association de core aux LD induit l'apposition de la membrane du LD et du RE générant un complexe membranaire lipidique où l'assemblage des virions serait initié (Andre et Lotteau 2008). Le complexe de réplication est majoritairement constitué des protéines NS3, NS5A et NS5B (Bartenschlager et Lohmann 2000). Enfin, l'association des protéines du VHC avec les LD est importante pour la production de particules infectieuses, soit les virions associés au LDL et VLDL (Miyanari *et al.* 2007). Bien que les mécanismes de bourgeonnement, d'assemblage et de sécrétion des particules infectieuses soient peu connus, des travaux

récents suggèrent que les virions infectieux sont formés à l'intérieur de la cellule et précèdent la sécrétion (Gastaminza *et al.* 2006; Miyanari *et al.* 2007). En effet, la densité des particules sécrétées diffère de la densité des particules intracellulaire (entre 1,03 g/ml et 1,16 g/ml pour les particules sécrétées et entre 1,15 g/ml et 1,20 g/ml pour les particules intracellulaires). La maturation et l'exportation des particules très infectieuses semblent donc nécessiter une association avec des lipides ou des lipoprotéines. Huang *et al.* ont montré que l'inhibition de apoB et de MTP (requis pour la formation de VLDL) inhibe la production de VHC infectieux (Huang *et al.* 2007; Ye 2007). Une hypothèse intéressante proposée est que le complexe de réplication recrute les LD par l'entremise de core pour emmagasiner les lipides nécessaires à la production des LVP (Andre et Lotteau 2008).

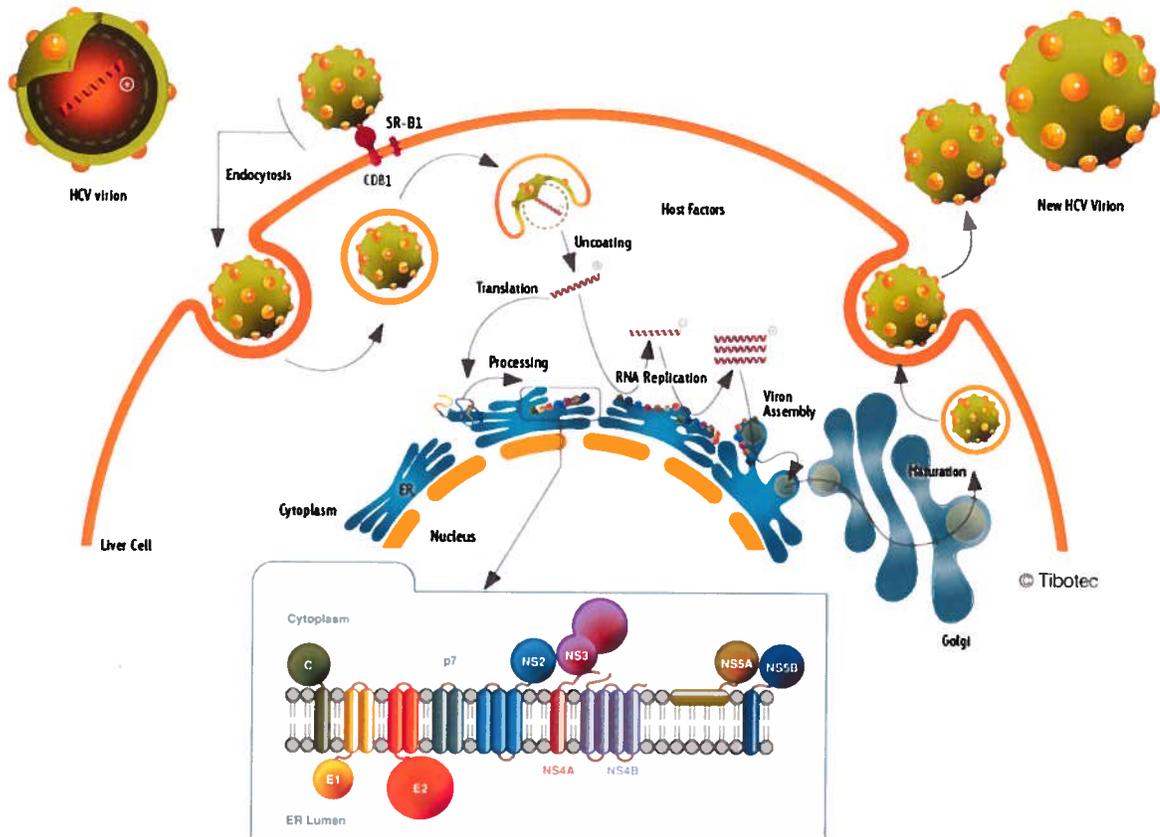


Figure 7 : **Modèle du cycle de réplication du VHC** (www.tibotec.com). Les lipo-viro particules s'attachent à la cellules par l'entremise de différents récepteurs et corécepteurs, mais la présence de CD81 est essentielle. Le virus entre dans la cellule par interaction avec d'autres récepteurs et corécepteurs et la présence de la cln-1 est essentielle. L'ARN du virus est relâché dans le cytoplasme, son génome est répliqué et traduit, possiblement au RE, en protéines structurales et non-structurales. Des nouveaux virions sont assemblés et recouverts de lipides et sortent de la cellule.

Section 2. Les proprotéines convertases

2.1 Généralités

Les proprotéines convertases (PC) sont des enzymes qui activent des protéines précurseurs par clivage protéolytique (Bassi *et al.* 2005). Des études récentes ont toutefois démontré que le clivage de certaines lipases endothéliales et de lipoprotéines peut être inactivé par les PC (Jin *et al.* 2005; Nassoury *et al.* 2007). Les PC jouent des rôles essentiels dans le déroulement de mécanismes physiologiques. Par exemple, elles activent certains facteurs de croissance, des hormones, des enzymes, des cytokines et des récepteurs cellulaires. On leur attribue des rôles importants dans le développement de certains cancers (Bassi *et al.* 2005), dans la régénération des tissus, dans les infections virales et bactériennes et dans la dyslipidémie (Seidah et Prat 2007).

Jusqu'à ce jour, neuf PC ont été identifiées incluant PC1/3, PC2, la furine, PC4, PC5/6, PACE4, PC7, SKI-1 et PCSK9 (figure 8). Tous les membres des PC possèdent un peptide signal à l'extrémité N-terminal, suivi d'un prosegment, d'un domaine catalytique et d'une séquence unique à l'extrémité C-terminal qui régule leur localisation cellulaire (Seidah et Prat 2007). Chez PC1/3, PC2, la furine, PC4, PC5/6, PACE4 et PC7 on retrouve en plus un domaine P qui stabilise le domaine catalytique. Ces sept premières convertases appartiennent à la famille des subtilases (Lopez 2008).

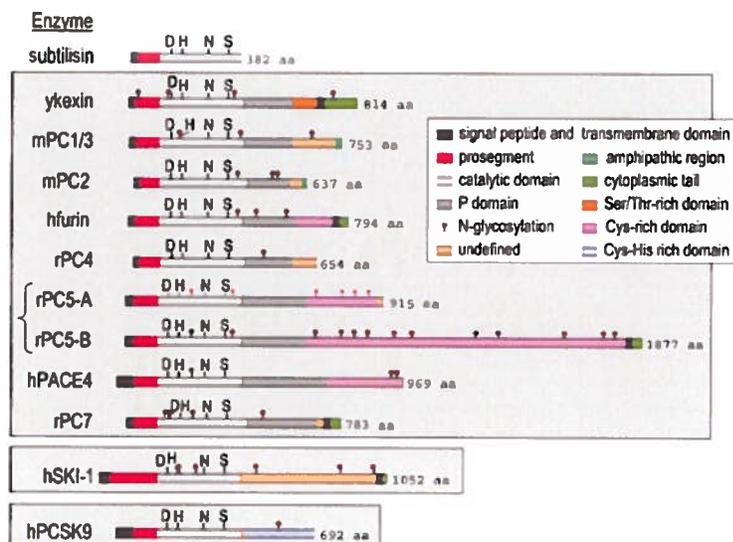


Figure 8 : Les neuf membres de la famille des proprotéines convertases (Seidah et Prat 2007).

2.2 Clivage protéolytique

Les sept premières convertases (PC1/3, PC2, la furine, PC4, PC5/6, PACE4 et PC7) reconnaissent une séquence spécifique d'acides aminés basiques $(K/R)-(X)_n-(K/R)_d$, où X est n'importe quel acide aminé sauf Cys et $n = 0, 2, 4$ ou 6 chez leur cible. La PC SKI-1 diffère des autres PC puisqu'elle reconnaît une séquence consensus d'acides aminés non basiques $(R/K)-X-(L,I,V)-Z$, où Z est tout acide aminé sauf Pro, Cys, Glu et Val (Scamuffa *et al.* 2006). Dans tous les cas, les neuf PC sont initialement synthétisées comme zymogènes inactifs et subissent un premier clivage autocatalytique qui se produit dans le RE, à l'exception de PC2, qui est clivée à l'intérieur des granules sécrétrices immatures (Seidah *et al.* 2008). Ce clivage initial génère un hétérodimère constitué du prosegment et du reste de la protéine. Le complexe prosegment-PC sort du RE et se dirige vers une organelle spécifique où l'activité catalytique aura lieu. Le second clivage consiste en un clivage autocatalytique du prosegment. Il est déclenché par un environnement acide et riche en calcium. Cette étape libère la convertase du prosegment inhibiteur et la protéine convertase devient alors biologiquement active. Ce mécanisme d'activation des zymogènes est très organisé si bien qu'on est assuré que les convertases sont actives uniquement dans les sites intracellulaires où les conditions de pH et de

calcium sont optimales pour le clivage des substrats spécifiques aux PC (Seidah et Prat 2007; Seidah *et al.* 2008). En effet, les PC sont des protéinases dépendantes du calcium (Bassi *et al.* 2005). Le portrait général du processus protéolytique des convertases est dressé, mais les mécanismes exacts ainsi que les substrats spécifiques ne sont pas encore bien définis puisque chaque PC est unique.

2.3 PC1/3

PC1/3 est une convertase neuroendocrine très importante (Scamuffa *et al.* 2006). Elle est retrouvée uniquement dans les tissus neuroendocriniens et comme PC2, on croit qu'elle serait responsable de la plupart des clivages des prohormones du système neuroendocrinien (Gagnon *et al.* 2008).

Les souris déficientes en PC1/3 ont de sévères retards de croissance. On observe chez ces souris une taille correspondant à 60 % de la taille normale. Les souris mutantes ont un phénotype ressemblant à des souris qui ont des déféctuosités dans le récepteur de l'hormone de croissance (GHRH) (Scamuffa *et al.* 2006). Le retard de croissance s'explique par les faibles niveaux du facteur de croissance de l'insuline 1 et du GHRH. On observe également chez les souris mutantes plusieurs autres anomalies dans le clivage de multiples précurseurs d'hormones.

2.4 PC2

PC2 est aussi connue pour réguler plusieurs précurseurs neuroendocriniens. PC2 joue un rôle important dans la conversion de la pro-insuline et du pro-glucagon. Elle est exprimée uniquement dans les cellules neuronales et les cellules endocrines et elle est activée par la furine (Seidah et Prat 2007). PC2 nécessite la protéine 7B2 (la sécrétogranine V) pour sa maturation et la régulation de son activité (Gagnon *et al.* 2008). Contrairement aux autres PC, PC2 subit un premier clivage autocatalytique dans les granules sécrétrices immatures (Seidah *et al.* 2008).

Les souris déficientes en PC2 sont viables et possèdent un phénotype normal à la naissance, mais montrent un retard de croissance. On révèle chez ces souris de sérieux troubles d'hypoglycémie et une déficience en glucagon dans la circulation. Plusieurs études ont démontré que PC2 n'est pas essentiel pour le développement de l'embryon, mais contrôle la maturation de plusieurs peptides régulateurs et de précurseurs de protéines (Seidah et Prat 2007).

2.5 La Furine

La furine est une protéine membranaire ubiquitaire. Elle est initialement produite en un précurseur de 104 kDa qui est rapidement converti en une forme active de 98 kDa (Seidah et Prat 2007). C'est la seule PC qui inactive des protéines, dans ce cas-ci, des lipases endothéliales et des lipases de lipoprotéines. Cependant, elle a aussi des rôles dans l'activation de précurseur. Entre autres, elle joue un rôle clé dans la régulation de la pression sanguine en activant le TGF β . Elle possède aussi comme substrat des intégrines tels $\alpha 4$ et des glycoprotéines virales. En général, la furine est impliquée dans le clivage de protéines qui sont sécrétées constitutivement. La furine rend biologiquement active la proprotéine convertase PC2 (Gagnon *et al.* 2008).

L'inactivation du gène *fur* (furine) cause la mort chez l'embryon dû à des déformations cardiaques (Roebroek *et al.* 1998; Dubois *et al.* 2001).

2.6 PC5/PC6

La proprotéine convertase PC5 (aussi appelé PC6) chez l'humain encode deux isoformes, soit PC5A (915 a.a.) et PC5B (1870 a.a.) (Seidah et Prat 2007). PC5A possède en C-terminal un domaine riche en cystéine (CRD) et PC5B possède en plus du CRD, un domaine transmembranaire et une queue cytosolique (Essalmani *et al.* 2008). Chaque zymogène subit deux clivages autocatalytiques consécutifs; un premier dans le RE et le second dans le trans-Golgi et/ou à la surface cellulaire. Cette dernière possibilité est due au fait que PC5A peut exercer son rôle protéolytique à la surface cellulaire puisqu'elle forme un complexe à la membrane plasmique avec un inhibiteur de métalloprotéases

(TIMPs) et des protéoglycans de type heparan sulfate (Seidah et Prat 2007; Essalmani *et al.* 2008). Pour sa part, PC5B est sécrétée. Les transcrits de PC5B dominent dans les intestins et les reins tandis que PC5A est l'isoforme la plus répandue dans les autres tissus (Essalmani *et al.* 2008). Les substrats de PC5 sont nombreux : des métalloprotéases de la matrice, des facteurs de croissance tels PDGF-A, des récepteurs comme IGF, des intégrines et des lipases. L'expression de PC5 est régulée à la hausse lors de la resténose artérielle ce qui suggère un rôle dans le contrôle de la sténose des artères. Aussi, le fort niveau d'expression de PC5 dans les entérocytes suggère un possible rôle dans la régulation de l'absorption des lipides (Seidah et Prat 2007).

Pour étudier le rôle physiologique de PC5, des souris dont l'allèle de PC5 manque l'exon 4 ont été générées. L'exon 4 possède l'acide aminé responsable de l'activité catalytique. Les souris hétérozygotes $\Delta 4/+$ sont en santé et fertile tandis que les souris homozygotes $\Delta 4/\Delta 4$ meurent au stade embryonnaire (Seidah et Prat 2007).

2.7 PACE4

PACE4 est exprimée de façon prédominante dans les testicules, mais on la retrouve dans une large distribution de tissus. Comme PC5/6A, PACE4 est activée à la surface membranaire et/ou dans le trans-Golgi. Ensemble, ces deux convertases représentent les candidats responsables du clivage d'enzymes sécrétées de façon constitutive comme les facteurs de croissance et les récepteurs. À la membrane plasmique, PACE4 est attachée aux heparans sulfates par son CRD et est sécrétée dans le milieu extracellulaire. Il est également connu que le CRD de PACE4 et de PC5/6A leur permet d'interagir avec TIMPs et HSPGs à la surface cellulaire. De cette façon, PACE4 et PC5/6 contribuent aux clivages des protéines liées aux HSPG pour les rendre biologiquement actives (Nour *et al.* 2005; Seidah *et al.* 2008).

Comme la furine, PACE4 est critique pour le développement normal de l'embryon, particulièrement durant le développement du système nerveux central antérieur. En

l'absence de PACE4, les embryons possèdent des malformations crâniennes et sont infertiles dû à des anomalies des spermatozoïdes (Scamuffa *et al.* 2006).

2.8 PC7

La convertase PC7 est ubiquitaire. Elle est activée dans le trans-Golgi et elle est recyclée à la surface cellulaire. Son homologie avec la furine est grande, si bien que les deux PC clivent les mêmes substrats tels PDGF, BMP et VEGF. Toutefois, PC7 est la PC la plus conservée et serait impliquée dans le clivage d'autres substrats non essentiels (Scamuffa *et al.* 2006).

Les souris déficientes en PC7 ont un phénotype normal (Scamuffa *et al.* 2006).

2.9 SKI-1

La proprotéine convertase SKI-1 clive dans une séquence spécifique d'acides aminés non basiques à l'intérieur du motif RX(V,L)(K,F,L)↓. La forme proSKI-1 s'autoclive en une protéine membranaire de 106 kDa et sous une forme sécrétée de 98 kDa. Le gène est exprimé de façon ubiquitaire et elle est localisée chez l'humain sur le chromosome 16 et sur le chromosome 8 chez la souris. En l'absence de stérol, SKI-1 clive le facteur de transcription membranaire SREBP qui relâche alors un facteur de transcription activé dans le cytosol. Ce dernier active, dans le noyau, la transcription du LDLR et tous les autres gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol et des acides gras. Au contraire, en présence de stérol, le clivage de SREBP est inhibé et ainsi la transcription du LDLR est fortement réduite. Le rôle de SKI-1 dans l'homéostasie du cholestérol est bien établi. SKI-1 clive aussi d'autres facteurs de transcription liés à la membrane tel le facteur ATF6, la somatostatine, CREB4 et des glycoprotéines virales (Seidah et Prat 2007).

Les souris déficientes en SKI-1 ne sont pas viables. La mort survient au stade du blastocyte. Chez des souris déficientes partiellement (conditionnellement) en SKI-1 au niveau du foie, la synthèse du cholestérol et des acides gras est réduite de 50 % (Seidah et Prat 2007).

2.10 Les proprotéines convertases et les agents infectieux

L'implication des convertases dans diverses infections virales et bactériennes est bien connue. En effet, les PC ont la capacité de cliver des toxines bactériennes et des glycoprotéines de surface de virus (Shiryayev *et al.* 2007). Dans un cas, le clivage par la convertase provoque un changement de conformation des glycoprotéines virales permettant ainsi aux virus de fusionner de façon spécifique aux récepteurs cellulaires cibles et d'infecter la cellule. Parmi les virus qui bénéficient des convertases on retrouve le VIH (gp160), le virus Influenza de la souche Hong Kong (HA), le virus Ebola (GP), le virus respiratoire syncytial (F), le virus de la fièvre jaune (prM), le virus Lassa, le virus de la chorioméningite lymphocytaire et le virus Crimean-Congo (Gn) (Basak *et al.* 2001; Scamuffa *et al.* 2006). Par exemple, la glycoprotéine Gn du virus de la fièvre hémorragique Crimean-Congo (CCHF) devient fonctionnelle suite au clivage par SKI-1 (Vincent *et al.* 2003). Aussi, la glycoprotéine gp160 du VIH est clivée par la furine (Denault et Leduc 1996). Dans l'autre cas, certaines toxines bactériennes fortement toxiques sont activées par les convertases. Parmi celles-ci, on retrouve la toxine PA83 de la bactérie de l'anthrax et les exotoxines de la bactérie *Pseudomonas* qui sont clivées par la furine (Basak *et al.* 2001). La conception d'inhibiteur compétiteur aux convertases pour prévenir l'activation des glycoprotéines ou des toxines est fortement étudiée.

Section 3. La proprotéine convertase substilisin kexin de type 9

3.1 Généralités

La proprotéine convertase substilisine kexin de type 9 (PCSK9), aussi appelé *neural apoptosis-regulated convertase 1* (NARC-1), est la dernière PC à avoir été découverte (Seidah *et al.* 2003). Elle est fortement exprimée dans le foie, le petit intestin et les reins (Seidah et Prat 2007) et on la retrouve dans le sang (Seidah et Prat 2007; Zhang *et al.* 2007). Le gène chez l'humain est localisé sur le chromosome 1p32.3 et il est d'une longueur de 22 kb. Il n'existe aucun substrat connu à PCSK9, sauf elle-même.

On s'est intéressé davantage à PCSK9 lorsque le gène a été corrélé à l'hypercholestérolémie-autosomale dominante (ADH) (Abifadel *et al.* 2003). Cette maladie génétique rare cause un taux de LDL sanguin très élevé dû principalement à la présence de mutations dans le gène du LDLR, mais une dérégulation dans la fonction de PCSK9 semble être aussi associée à l'ADH. Il existe un lien entre PCSK9 et le cholestérol, car PCSK9 régule le niveau du récepteur du LDL (LDLR). En effet, chez la souris déficiente en PCSK9, on observe une augmentation de la quantité du LDLR et une diminution du LDL en circulation, caractéristique de l'hypocholestérolémie. Inversement, la surexpression de PCSK9 dans le foie de souris cause l'hypercholestérolémie (Schmidt *et al.* 2008). Depuis peu, Poirier et al. ont été identifiées deux nouvelles cibles (protéines menées vers la dégradation) à PCSK9, soit ApoER2 et le VLDLR (Poirier *et al.* 2008). Il est évident que PCSK9 est un joueur clé dans le maintien de l'équilibre du cholestérol.

3.2 Structure

La protéine PCSK9 est constituée d'un peptide signal de 30 acides aminés, d'un prodomaine (a.a. 31-152), d'un domaine catalytique (a.a. 143-452) et d'un domaine CRD en C-terminal (a.a. 453-692) (Lopez 2008) (figure 9). Les 30 premiers acides aminés du prodomaine sont désordonnés, mais les résidus 61 à 152 forment cinq feuillets β antiparallèles couverts par deux hélices α sur un côté. Le feuillet β forme l'interface entre le prodomaine et le domaine catalytique par différentes interactions hydrophobiques et électrostatiques (Lopez 2008).

La partie centrale du domaine catalytique consiste en 7 feuillets β en parallèle positionné entre une série d'hélices α . On retrouve aussi à l'intérieur de cette région trois ponts disulfures. Les quatre acides aminés impliqués dans l'activité catalytique sont l'Asp186, l'His226, l'Asn317 et la Ser386.

Le domaine CRD est composé de trois sous-domaines (SD1, SD2, SD3) organisés en pseudofeuillets sans hélices α . Chaque sous-domaine consiste en trois ponts disulfures : entre la 1^{ère} et la 6^e cystéine, entre la 2^e et la 5^e cystéine et entre la 3^e et la 4^e cystéine traversant des feuillets β β 1- β 6, β 2- β 6 et β 3- β 5 (Lopez 2008).

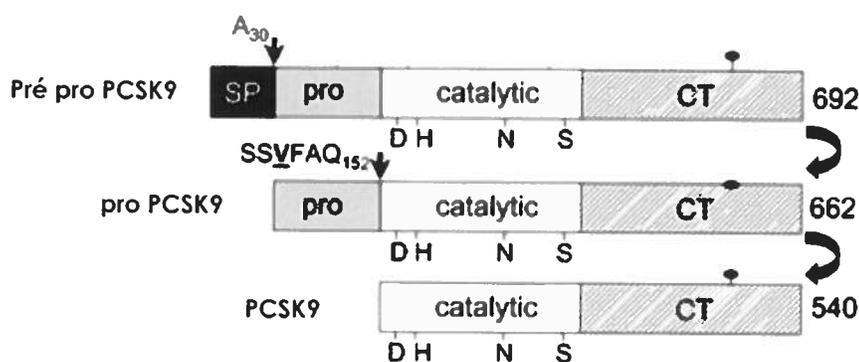


Figure 9 : **Domaine du gène PCSK9** (Lopez 2008). Le signal peptide est clivé à l'alanine de la position 30 puis PCSK9 s'autoclive à la position 152 pour générer une protéine de 540 acides aminés. Peptide signal (SP); prodomaine (pro); domaine catalytique (catalytic); queue cytoplasmique (CT).

3.3 Maturation

PCSK9, comme les autres PC, doit s'autocliner pour s'activer. La protéolyse prend place dans le réticulum endoplasmique (RE). PCSK9 est synthétisé en un zymogène soluble de 74 kDa (figure 9). Il subit d'abord un clivage au niveau de son peptide signal à l'alanine de la position 30. Ensuite, PCSK9 s'autoclive après le prosegment (14 kDa) à la valine de la position 152 qui se retrouve à l'intérieure de la séquence SVFAQ↓152 pour former la protéine active de 60 kDa. Contrairement aux autres PC, le prosegment demeure attaché à PCSK9 (Benjannet *et al.* 2004; Lopez 2008).

L'arginine 218 chez PCSK9 est un résidu conservé entre espèces et il est retrouvé dans un motif RXXR ou KXXXXR, séquence reconnue par la furine et PC5/6. Des études ont démontré que la furine et PC5/6 peuvent cliver PCSK9 *in vitro* en une protéine de 53 kDa. Cette forme tronquée de PCSK9 est inactive. Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider si ce second clivage est significatif *in vivo* (Lopez 2008).

3.4 Mécanismes d'action

Le principal rôle connu de PCSK9 chez l'humain est de réguler le niveau de LDLR à la surface des hépatocytes (figure 10). Le mécanisme qu'utilise PCSK9 pour mener le LDLR vers la dégradation n'est pas clairement défini, mais des études suggèrent son

mécanisme d'action. D'abord, après sa maturation, PCSK9 est sécrété dans le milieu extracellulaire sous une forme soluble liée à son prodomaine (Benjannet *et al.* 2004). Selon Qian *et al.*, la concentration de PCSK9 retrouvée dans le sang chez l'humain se situe entre 50 et 600 ng/ml (Qian *et al.* 2007). À l'heure actuelle, on ne sait pas si PCSK9 circule dans le plasma associé à des particules de LDL ou s'il circule librement. Ensuite, PCSK9 s'attache au LDLR à la surface des hépatocytes. C'est suite à des études par Kwon *et al.* (2008) qu'on a découvert que l'ajout de PCSK9 au milieu de culture d'hépatocytes diminue de façon dramatique la quantité de LDLR à la surface cellulaire. Par la suite, ils ont identifié le site de liaison de PCSK9 au LDLR. Selon ces études, PCSK9 s'attache directement au premier domaine EGF (EGF-A) du LDLR, qui est un domaine extracellulaire. Cette observation a été renforcée en démontrant que des mutations dans l'EGF-A inhibent l'attachement de PCSK9 et prévient aussi la dégradation de LDLR. La structure cristallographique du complexe PCSK9-EGF-A a permis d'identifier que les acides aminés Arg194 et Phe379 de PCSK9 jouent un rôle critique dans l'attachement à l'EGF-A (Kwon *et al.* 2008), mais que ce sont les acides aminés Leu318 et Cys319 de EGF-A qui contribuent à la spécificité de l'interaction PCSK9-LDLR (Lopez 2008). De plus, un site liant le calcium est présent en N-terminal de EGF-A et un second, à l'interface de EGF-B. Ces sites sont nécessaires à PCSK9 pour se lier au LDLR. L'ARH (*autosomal recessive hypercholesterolemia*), une protéine adaptatrice, est également nécessaire à l'internalisation du LDLR (Kwon *et al.* 2008). Ensuite, le complexe PCSK9-LDLR est endocyté de façon clathrine-dépendante et poursuit par la voie endosomale (Qian *et al.* 2007). Li, J *et al.* ont quant à eux démontré que l'internalisation du LDLR est indépendante de l'activité catalytique de PCSK9 (Li *et al.* 2007). Dans son parcours vers l'endosome, la liaison entre PCSK9 et LDLR s'intensifie due à l'acidification de l'environnement (Zhang *et al.* 2007). Normalement, dans l'endosome, le pH acide induit un changement de conformation du LDLR lui permettant de relâcher son ligand, le LDL, et d'être lui-même recyclé à la surface cellulaire. Cependant, la forte affinité de PCSK9 au LDLR empêche le recyclage du LDLR. En conséquence, le LDLR est délivré au lysosome où il est dégradé (Zhang *et al.* 2007).

Des études ont démontré que le LDLR joue un rôle critique dans le transport de PCSK9 du RE aux endosomes. En fait, Nassoury *et al.* ont montré que dans des cellules où le LDLR est absent, PCSK9 est confiné au réticulum endoplasmique tandis que lorsque les deux protéines sont présentes, PCSK9 est toujours colocalisé avec le LDLR dans les différents compartiments cellulaires (Mayne *et al.* 2007; Nassoury *et al.* 2007). PCSK9 est donc en quelque sorte dépendant du LDLR. En contrepartie, le destin du LDLR n'est pas exclusivement dicté par PCSK9 puisque le LDLR est exprimé dans des tissus où PCSK9 est absent (ganglions dorsaux et spinaux et les dents). Ceci suggère qu'un tiers partenaire pourrait participer à la régulation du LDLR. Cette dernière hypothèse n'est nullement confirmée, mais est plausible puisque l'incubation des cellules COS-1 avec du PCSK9 soluble mène à une interaction entre le LDLR et PCSK9, mais sans aucun signe de dégradation du LDLR (Lopez 2008; Poirier *et al.* 2008). Ces résultats suggèrent que PCSK9 pourrait nécessiter la présence d'un facteur spécifique pour amener le LDLR vers la dégradation. Ce partenaire pourrait être présent soit à la surface cellulaire ou être un facteur endogène, mais pas en association avec lui (Lopez 2008). L'hypothèse d'un facteur additionnel est soutenue aussi par le fait qu'il n'existe aucune preuve que PCSK9 clive directement le LDLR.

Seidah *et al.* (2008) ont démontré que PCSK9 se lie *in vitro* à deux autres protéines transmembranaires fortement similaires au LDLR, soit le récepteur du VLDL (VLDLR) et apoER2. Le VLDLR a 59 % d'homologie avec le LDLR et 46 % avec apoER2. La dégradation de ces deux protéines est également indépendante de l'activité catalytique de PCSK9 (Poirier *et al.* 2008).

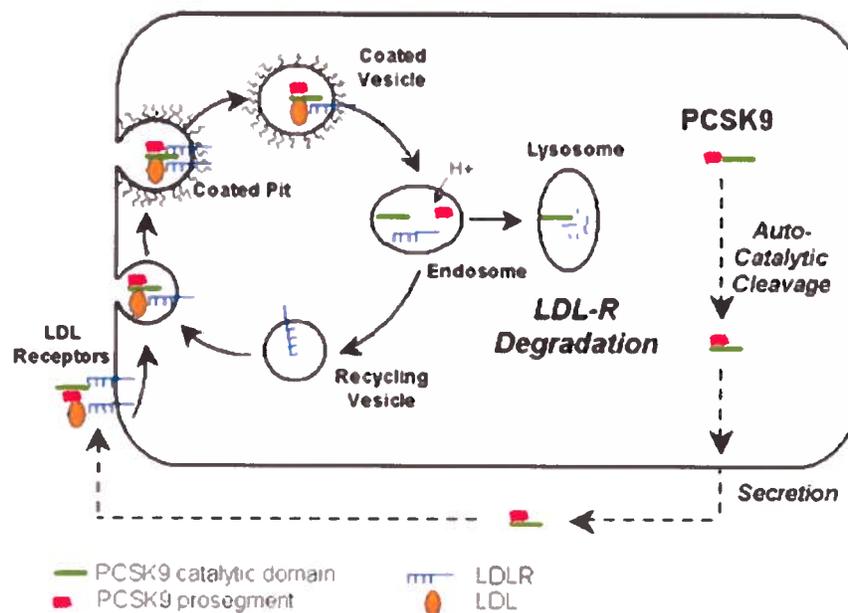


Figure 10 : **Modèle du mécanisme d'action de PCSK9** (Lambert *et al.* 2008). PCSK9 est sécrété dans le sang lié à son prodomaine. Il circule librement avant d'interagir avec le LDLR à la surface des hépatocytes. Le complexe LDLR-PCSK9 est ensuite endocyté dans des vésicules et poursuit la voie endosomale. L'acidification du milieu augmente l'affinité de PCSK9 pour le LDLR à tel point que le complexe n'est pas dissocié mais dirigé vers le lysosome où le LDLR est dégradé. En absence de PCSK9, le LDLR est recyclé à la surface cellulaire.

3.5 Dyslipidémie et mutants de PCSK9

3.5.1 Notions sur l'homéostasie des lipides

L'athérosclérose et les maladies coronariennes artérielles (CAD) sont deux causes majeures de mortalité dans les pays développés. Les facteurs de risques de développer des maladies cardiovasculaires incluent l'hypertension, le diabète, la cigarette, l'obésité, l'âge, le stress et la dyslipidémie. La dyslipidémie est le facteur de risque le plus important. Il consiste en un ratio élevé de cholestérol de faible densité (LDL-c) par rapport au cholestérol de haute densité (HDL-c). On acquiert le LDL-c et le HDL-c de façon exogène (par l'alimentation) ou de manière endogène (par le foie). On évalue que les chances de développer une maladie liée au cholestérol sont faibles lorsque le ratio de LDL-c/HDL-c est petit (Seidah et Prat 2007).

Le LDL, le HDL et le VLDL sont des lipoprotéines. Le rôle des lipoprotéines est de transporter les molécules hydrophobes (ester de cholestérol et triglycérides) entre les organes par le sang. Ce sont des macromolécules constituées d'une enveloppe de phospholipides et de protéines et d'un corps de triglycérides et d'esters de cholestérol (figure 11). Les particules de LDL sont composées principalement de la protéine apoB et les particules de VLDL sont composées principalement de la protéine apoE, mais contiennent également de l'apoB. Ces lipoprotéines sont athérogéniques, c'est-à-dire qu'elles causent l'athérosclérose. La concentration de LDL-c dans le plasma est déterminée par la vitesse de formation des particules VLDL et LDL par le foie et la vitesse à laquelle elles sont internalisées via le LDLR (Park *et al.* 2004). Le LDLR a pour principal ligand apoB ce qui permet au LDL circulant dans le sang d'interagir directement avec le LDLR à la surface cellulaire et d'être endocyté. Dans l'endosome, le pH acide induit un changement de conformation du LDLR et son ligand est relâché. Le LDLR est lui recyclé à la surface cellulaire. Des mutations dans les gènes du LDLR, de apoB et de PCSK9 entraîne une dyslipidémie.

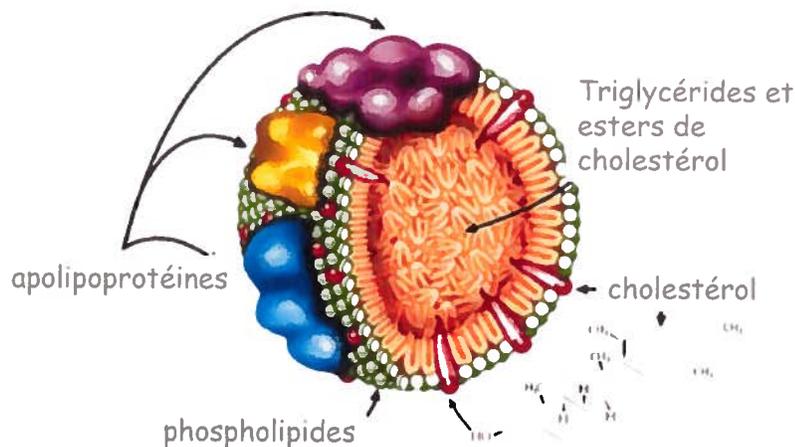


Figure 11 : Structure des lipoprotéines.

3.5.2 Rôle de PCSK9 dans la dyslipidémie

L'hypercholestérolémie autosomale dominante se résume en un taux élevé de cholestérol de type LDL dans le sang et c'est un facteur de risque pour développer des maladies cardiovasculaires. Cette maladie est associée à des mutations dans les gènes du LDLR et

de apoB et récemment, de PCSK9. PCSK9 est maintenant le troisième gène d'importance à être corrélé à l'hypercholestérolémie familiale. Les premiers liens entre PCSK9 et l'ADH ont été établis par Abifadel *et al.* (2003) qui ont identifié deux mutations dans le gène de PCSK9 reliées à l'hypercholestérolémie (Abifadel *et al.* 2003) (figure 12). En effet, les mutations S127R et F216L ont été détectées chez des familles françaises. Par la suite, la mutation D374Y a été identifiée chez différentes familles de l'Utah et de la Norvège et par la suite plusieurs autres mutations menant toutes à l'hypercholestérolémie ont été trouvées. Les personnes possédant ces mutations ont en commun un niveau de cholestérol de type LDL de 2 à 6 fois plus élevé que la normale. En fait, ces mutations dites " gains de fonction " confèrent à PCSK9 une capacité plus élevée à dégrader le LDLR que le PCSK9 sauvage. L'interaction entre ces mutants de PCSK9 et le LDLR est 5 à 30 fois plus grande que l'interaction que l'on retrouve entre le LDLR et PCSK9 sauvage. L'interprétation du mode d'action de ces mutants est difficile puisqu'il manque des informations sur le mécanisme d'action de PCSK9 sauvage. Toutefois, on sait que la mutation D374Y est présente à la surface de PCSK9 et ne fait aucun contact avec d'autres acides aminés dans la structure de PCSK9. Il a été proposé que cette mutation cause une augmentation de l'affinité pour le LDLR en permettant la formation d'un pont hydrogène entre PCSK9 et l'histidine 306 du domaine EGF-A du LDLR. Quant à eux, les mutants F216L et R218S n'ont pas la capacité de subir le deuxième clivage autocatalytique du prosegment et on croit que c'est le mécanisme menant à l'hypercholestérolémie familiale. Très peu est connu sur l'effet des autres mutations. On spécule qu'elles pourraient affecter la fonction de PCSK9 en altérant son affinité avec différentes protéines partenaires ou affecter sa susceptibilité à être dégradé par des protéases (Lambert *et al.* 2008).

D'autres mutations confèrent à PCSK9 une "perte de fonction", c'est-à-dire que sa capacité à dégrader le LDLR est réduite. Lorsqu'il y a plus de LDLR exprimés à la surface cellulaire, il y a moins de LDL en circulation dans le sang. Les personnes possédant ce type de mutants de PCSK9 souffrent d'hypocholestérolémie (Cohen *et al.* 2005; Kotowski *et al.* 2006). Trois mutations (L82X, Y142X et C679X) résultent en une forme tronquée de PCSK9 affectant son repliement et sa sécrétion (Zhao *et al.* 2006).

L82X et Y142X terminent prématurément la traduction de la protéine à l'intérieure du prodomaine. La mutation C679X empêche la sécrétion de PCSK9 dû à l'absence d'un pont disulfide dans le domaine en C-terminal retenant PCSK9 dans le RE. Les nombreuses autres mutations (G106R, Δ R97, L253F, N157K et H391N) donnent à PCSK9 soit une incapacité de bien se replier ou à s'autocliner, mais résulte toutes en une faible concentration de LDL plasmatique (Seidah et Prat 2007; Lambert *et al.* 2008) (figure 12).

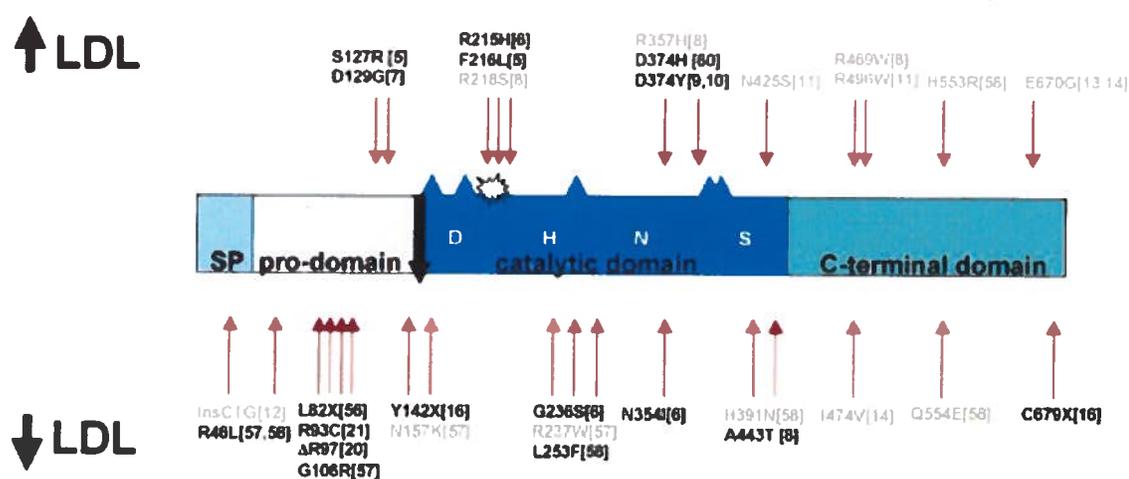


Figure 12 : Mutations dans le gène PCSK9 (Lambert *et al.* 2008).

3.6 Régulation de PCSK9

L'ARNm de PCSK9 est régulé à la hausse par les statines et le SREBP-2 et régulé à la baisse par un excès de cholestérol dans l'alimentation (Nassoury *et al.* 2007). Le SREBP-2 est synthétisé en un précurseur inactif dans le RE. Pour être actif, le segment N-terminal NH₂ du SREBP doit être relâché de la membrane et entrer dans le noyau (Park *et al.* 2004). L'activation de SREBP requiert SCAP, une protéine qui escorte SREBP du RE au Golgi et S1P et S2P qui sont localisés dans le Golgi. Lorsque la membrane du RE commence à être déplétée en cholestérol, SCAP transporte SREBP-2 au Golgi, où il subit deux clivages protéolytiques consécutifs par S1P et S2P (Park *et al.* 2004). Ces clivages permettent le relâchement de la partie active du SREBP qui se rend alors au noyau où il active la transcription d'une douzaine de gènes nécessaires à la biosynthèse des lipides.

Lorsque la teneur en cholestérol augmente dans la membrane cellulaire, le processus de clivage protéolytique est bloqué, le SREBP demeure attaché et la transcription des gènes cibles diminue (Sakai *et al.* 1998).

Objectifs et hypothèses

Le rôle naturel de PCSK9 de mener le LDLR vers la dégradation en fait une cible évidente pour le développement d'un agent thérapeutique pour traiter la dyslipidémie. Aussi, l'habileté de PCSK9 de réguler le LDLR sur les hépatocytes est également intéressante dans le cas de l'étude sur le virus de l'hépatite C. En effet, le LDLR est un récepteur important dans l'entrée du virus dans la cellule. **Dans ce sens, nous avons voulu étudier l'impact de PCSK9 sur l'infection par le VHC en observant l'effet sur l'expression de trois des récepteurs du VHC, soit le LDLR, le CD81 et le SR-BI.**

Nous croyons qu'une forme plus active de PCSK9 peut nuire à l'infection du VHC en diminuant l'expression du LDLR à la surface cellulaire, mais également en régulant à la baisse l'expression du CD81. Notre hypothèse repose d'une part sur le fait que les proprotéines convertases sont connues pour activer des protéines virales. D'autre part, une comparaison des séquences des cibles connues de PCSK9, soit le LDLR, le apoER2, et le VLDLR avec la séquence du CD81 montre une homologie. En effet, cette homologie indique la possibilité d'une interaction potentielle entre PCSK9 et CD81 qui mènerait le CD81 vers la dégradation.

Chapitre 2

Article scientifique

Contribution des auteurs

Une entente préalable entre Dr. Patrick Labonté et Dr. Nabil G. Seidah s'est fait avant l'arrivée à la maîtrise de l'étudiante Syntia Begley. Cette entente stipulait que, advenant la publication d'un premier article sur PCSK9 et le virus de l'hépatite C, le premier auteur devait être Dr. Labonté et le dernier auteur Dr. Seidah. C'est la raison pour laquelle le nom du Dr. Labonté apparaît le premier sur l'article.

La majorité des résultats ont été produits par **Syntia Begley**. Les figures 1, 2, 3, 4, 5 et 6A sont issues des recherches de Syntia Begley et ont été réalisées par elle. Toutes les manipulations relatives à ces résultats ont été faites par elle.

La figure 3, soit les photos d'immunofluorescence montrées dans l'article, est celle réalisée par **Nasha Nassoury** (IRCM). Toutefois, Syntia Begley a mis au point la technique d'immunofluorescence par marquage avec les anticorps contre CD81 et a généré les mêmes résultats, mais pour des raisons de qualité d'image, les photos publiées sont celles de Nasha Nassoury.

Carl Guévin, étudiant au doctorat dans le laboratoire du Dr. Labonté, a mis au point les techniques de production de virus *in vitro* et de quantification virale (RT-PCR de type Taqman).

Gaétan Mayer, post-doctorat dans le laboratoire du Dr. Annik Prat, a réalisé les manipulations pour générer les résultats présentés dans la figure 7B. Cette figure montre des coupes de tissu du foie de souris déplétées et transgéniques en LDLR et/ou en PCSK9. Les expériences réalisées *in vivo* ont été réalisées dans les laboratoires du Dr. Prat et du Dr. Seidah (IRCM).

Dr. Patrick Labonté, directeur de recherche de Syntia Begley, a fait les manipulations pour générer les résultats de la figure 6B-C et 7A. Pour la figure 7A, les extraits protéiques du foie des souris transgéniques ont été fournis par le laboratoire du Dr. Seidah. Le Dr. Patrick Labonté a contribué à l'interprétation des résultats et à la discussion présentée dans l'article.

Version acceptée de l'Article

PCSK9 IMPEDES HCV INFECTION *IN VITRO* AND MODULATES LIVER CD81 EXPRESSION

Patrick Labonté†¶, Syntia Begley‡, Carl Guévin‡, Marie-Claude Asselin§, Nasha Nassoury§, Gaétan Mayer§, Annik Prat§, Nabil G. Seidah§

Patrick Labonté; patrick.labonte@iaf.inrs.ca ; Syntia Begley; syntia.begley@iaf.inrs.ca

Carl Guévin; carl.guevin@iaf.inrs.ca ; Marie-Claude Asselin; marie-claude.asselin@ircm.qc.ca

Nasha Nassoury; nashanassoury@juno.com; Gaétan Mayer; gaetan.mayer@ircm.qc.ca

Annik Prat; annick.prat@ircm.qc.ca ; Nabil G. Seidah; seidahn@ircm.qc.ca

† INRS-Institut Armand-Frappier, INRS, 531 blvd des Prairies, Laval, Canada H7V 1B7

§ Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, IRCM, Montreal, Canada H2W 1R7

Key words: LDLR, proprotein convertase, cholesterol, CD81, HCV

Contact information: Patrick Labonté, 531 blvd des Prairies, Laval, Canada H7V 1B7

Phone: 450-687-5010, Fax: 450-686-5314, E-mail: Patrick.labonte@iaf.inrs.ca

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; SR-BI, scavenger receptor class B type 1 ; LDLR, low-density lipoprotein receptor; HCVcc, cell-culture adapted HCV; PCSK9, proprotein convertase subtilisin kexin type 9; ACE2, angiotensin converting enzyme 2; VLDL, very low-density lipoprotein; HCVpp, hepatitis C virus pseudo-particles; TM, transmembrane domain; CT, cytoplasmic tail; GE, genome equivalent; Lamp1; lysosomal-associated membrane protein 1; KO, knockout.

PL was supported by the FRSQ salary support #8328 and a grant from the CRSNG/NSERC #31225.

NGS was supported by grants from the CIHR MOP 36496 and a Canada Chair #20652.

Human PCSK9 is known to enhance the degradation of membrane bound receptors such as the hepatocyte LDLR, ApoER2 and VLDLR. Since the LDLR is suspected to be involved in HCV entry, we also tested whether PCSK9 can affect the levels of CD81, a major HCV receptor. Interestingly, stable expression of PCSK9 or a more active membrane-bound form of the protein (PCSK9-ACE2) resulted in a marked reduction in CD81 and LDLR expression. Therefore, we analyzed the antiviral effect of PCSK9 *in vitro* using the HCV genotype 2a (JFH1) virus. The results clearly demonstrated that cells expressing PCSK9 or PCSK9-ACE2, but not the ACE2 control protein, were resistant to HCV infection. Furthermore, addition of purified soluble PCSK9 to cell culture supernatant impeded HCV infection in a dose-dependent manner. As expected, HuH7 cells expressing PCSK9-ACE2 were also resistant to infection by HCV pseudo-particles (HCVpp). In addition, we showed that CD81 cell surface expression is modulated by PCSK9 in an LDLR-independent manner. Finally, in the liver of single *Pcsk9* and double (*Pcsk9 + Ldlr*) knockout mice, both CD81 and LDLR protein expression levels were significantly reduced, but not those of transferrin and SR-BI.

Conclusion: Our results demonstrated an antiviral effect of the circulating liver PCSK9 on HCV in cells and that PCSK9 downregulates the level of mouse liver CD81 expression *in vivo*. Therefore, we propose that the plasma level and/or activity of PCSK9 may modulate HCV infectivity in human.

The hepatitis C virus (HCV) is a worldwide leading cause of chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (1). In the absence of a prophylactic vaccine or a specific antiviral agent, the best treatment currently available for HCV infection is the combination therapy of peg-interferon and ribavirin (2). HCV is a positive strand RNA enveloped virus classified as a *Hepacivirus* within the *Flaviviridae* family (3).

Viral entry within target cells, primarily human hepatocytes, is not very well understood. Several cell surface proteins have been suggested to play a role in the binding of HCV to hepatocytes and/or be critical for viral entry (4, 5). Among acknowledged receptors or co-receptors of HCV are: CD81 (6), scavenger receptor class B type I (SR-BI) (7), low-density lipoprotein receptor (LDLR) (8) and the recently identified Claudin-1, -6 and -9 (9) and Occludin (10). However, it is unclear which one(s) are required for viral propagation *in vivo*. Indeed, HCV particles recovered from infected plasma migrated at two distinct densities (1.25 g/ml and 1.06 g/ml) (11, 12). It has been suggested that the most infectious virus is located in the low-density fraction that corresponds to lipovirions of HCV coated with apolipoprotein B and E (11). Since LDLR controls the uptake of circulating cholesterol principally through internalization of apolipoprotein B- and E-containing lipoproteins, such as LDL and VLDL, the implication of LDLR as a non-specific receptor for HCV entry may be significant, at least *in vivo*.

PCSK9, the latest member of the proprotein convertase family (13, 14) has been extensively studied for its ability to regulate the cell surface levels of the LDLR (14-16). Individuals with PCSK9 gain-of-function mutations exhibit hypercholesterolemia, whereas loss-of-function mutations result in hypocholesterolemia (17, 18). Recently, it has been demonstrated that PCSK9 interaction with cell surface LDLR in hepatocytes results in the enhanced degradation of the receptor both *ex vivo* (16, 19) and *in vivo* (20, 21), thereby reducing the uptake of circulating LDL-cholesterol by cells. In human and mouse, PCSK9 is found as a soluble protein, which is secreted in the bloodstream mostly by hepatocytes (21-23). It has been shown that fusion of a transmembrane-cytosolic tail (TM-CT) segment at the C-terminus of wild type PCSK9 (PCSK9-wt), such as that of the cell surface metalloproteinase ACE2 (PCSK9-ACE2) or of the lysosomal protein Lamp1 (PCSK9-Lamp1), results in a membrane-bound non-secreted PCSK9, which is much more potent in enhancing the

degradation of the LDLR and its two closest family members VLDLR and ApoER2 (24). We used these chimeras to reduce the LDLR expression and to evaluate their effects on HCV JFH1 infection of HuH7 cells.

The data revealed that expression of PCSK9 or its chimeras in otherwise susceptible HuH7 cells, blocks infection by HCV JFH1. Surprisingly, PCSK9 reduces not only the surface expression of LDLR but also of CD81, a major HCV receptor. Since high levels of CD81 expression are required for HCV infection of HuH7 cells *in vitro* (25), we suggest that PCSK9 may prevent cellular HCV entry through both LDLR and CD81.

RESULTS

PCSK9 Expression in Stable Cell Lines. HuH7 cells stably expressing PCSK9-wt, PCSK9-ACE2, ACE2 (Fig. 1A) or the empty vector phCMV3 were sorted by FACS to isolate the ~10% highest expressors of cell surface PCSK9 (Fig. 1B), as confirmed by immunoblotting of cell lysates (Fig. 1C). While PCSK9-wt is mostly secreted in the media with ~1-5% remaining bound to the cell-surface LDLR (26), In contrast, a large amount of total PCSK9-ACE2 remains attached to the cell surface (24) through the transmembrane domain of ACE2 (Fig. 1D). Immunocytochemistry of these stable cells revealed that just like PCSK9-wt, the chimeric protein PCSK9-ACE2 is detected in perinuclear locations (reminiscent of the endoplasmic reticulum), but is also abundantly concentrated at the cell surface (Fig. 1E).

PCSK9 Expression Removes Both LDLR and CD81 from the Cell Surface. To verify if the only HCV receptor affected by PCSK9 was the LDLR, we analyzed the fate of the cell surface expression of CD81. Thus, cell surface CD81 levels were compared in HuH7 cells expressing PCSK9-wt, PCSK9-ACE2, ACE2 or an empty-vector. FACS analysis revealed that PCSK9-wt and PCSK9-ACE2 not only reduced the LDLR protein level but also that of CD81 (Fig. 2). As controls, we showed that the levels of cell surface transferrin receptor (CD71) and the HCV receptor Claudin-1 were not affected by PCSK9 (supplementary Fig. S1).

CD81 Expression in Cells Expressing PCSK9. To further examine the effects of PCSK9 expression, we determined the intracellular distribution of CD81 upon transient transfection of HuH7 cells with PCSK9-wt, PCSK9-ACE2 and PCSK9-Lamp1 (24). We opted to perform transient transfections, as opposed of the use of stable cell lines, in order to compare side-by-side HuH7 cells with similar expression levels of the different PCSK9 forms. Under these

conditions, the various forms of PCSK9 were visualized using our PCSK9 antibody at 48h post-transfection (Fig. 3), which represent ~30% of all HuH7 cells, a number compatible with the known low transfectability of these cells (24). In agreement with our previous data above, CD81 was completely absent in a large proportion of cells expressing either forms of PCSK9 (Figs. 3F, I, L). The loss of CD81 is dependent on PCSK9 expression since all cells transfected with the control plasmid do express CD81 (Fig. 3B). Interestingly, while the secretable PCSK9-wt did diminish the levels of CD81 in some of neighbouring cells not expressing PCSK9 (Figs. 3F), the membrane-bound forms did not (Figs. 3I, L).

PCSK9 Inhibits Infection by HCV JFH1. We evaluated the effect of PCSK9 on HCV propagation 3-days post-infection. Immunofluorescence revealed that cells expressing PCSK9-ACE2 and, to a lesser extent PCSK9-wt, had a reduced number of foci expressing NS5A, as compared to HuH7 cells expressing ACE2 alone or the empty vector (Fig. 4A). HuH7 cells stably expressing PCSK9-ACE2 are more resistant to HCV JFH1 as only very rare single cells are stained for NS5A and no colony could be detected. To determine if the continuous expression of high levels of PCSK9-wt and PCSK9-ACE2 could interfere with HCV propagation, we infected different HuH7 cell population with HCV JFH-1 for 15-days. Following normalization of the emitted chemiluminescence of the immunoreactive NS5A protein with respect to β -actin levels (Fig. 4B, inset), the data revealed that at 15-days post-infection of HuH7 cells expressing PCSK9-ACE2 or PCSK9-wt, there was either no detection (<1%), or a marked reduction (<8%) of the viral non-structural protein NS5A, respectively (Fig. 4B). Using quantitative RT-PCR, we showed that expression of PCSK9-wt and PCSK9-ACE2 protein reduce by >90% and >99.9% the quantity of HCV genome, respectively (Fig. 4C). As a negative control, we used the full-length ACE2 protein, and show that the TM-CT domain of ACE2 in PCSK9-ACE2 was not responsible for the observed inhibition of infection

(Fig. 4C). The above results demonstrate that PCSK9-wt and PCSK9-ACE2 strongly inhibit the HCV viral burden resulting from both short and long infection periods.

Soluble PCSK9 inhibits HCV infection in a dose dependent manner. Next, we sought to confirm that the effect observed on viral replication was due to a *bona fide* PCSK9 protein activity and not to a cell defect that appeared following the selection of the stable cellular pool. Accordingly, prior to infection naïve HuH7 cells were pre-incubated with various concentrations of purified soluble PCSK9 up to 15 µg/ml (Fig. 5) (27). The number of foci revealed that in a dose-dependent manner PCSK9 can inhibit HCV infection up to 2.5-fold (Fig. 5A), demonstrating that PCSK9 is the mediator of the observed viral inhibition.

PCSK9-ACE2 inhibits HCVpp infection. To confirm that CD81 is critical for the loss of infectivity in PCSK9 positive cells, we used HCV pseudoparticles (HCVpp) and VSV pseudoparticles (VSVpp) as control. HCVpp are produced in HEK293 cells and are devoid of lipoproteins on their surface, preventing their interaction with the LDLR (28). Therefore, HCVpp infection is thought to be mainly mediated through the CD81 receptor (5). The results presented in Fig. 6A show that HCVpp can infect normal HuH7 cells or the ACE2-expressing control cells, but not cells expressing PCSK9-ACE2 (>80% inhibition). Therefore, with HCVpp, the reduction of infectivity correlates with CD81 expression.

PCSK9 removes CD81 in an LDLR-independent fashion. To define the implication of the LDLR in the CD81-enhanced degradation by PCSK9, we sought to reduce the level of LDLR in PCSK9-ACE2 expressing HuH7 cells using a knockdown approach. Accordingly, two siRNAs (A and B) directed against the LDLR were tested and the results showed that only siRNA-A significantly reduced LDLR expression (>78%; Fig. 6B). To investigate the molecular interaction between PCSK9, LDLR and CD81, we incubated naïve HuH7 cells and

HuH7 cells stably expressing PCSK9-ACE2 with siRNA-A and quantitated the levels of CD81 by Western blotting (Fig. 6C). In our hands, the CD81 detected by the widely used 5A6 monoclonal antibody appeared as two bands migrating with molecular masses below ~21 kDa, as was previously observed in HuH7 cells (29, 30). Accordingly, knockdown of LDLR mRNA in HuH7 cells expressing PCSK9-ACE2 results in a significant reduction of immunoreactive CD81 levels (>79%), but does not affect the level of CD81 in normal HuH7 cells (Fig. 6C). These data show that the reduction of CD81 protein levels by PCSK9 does not require the presence of LDLR.

Analysis of CD81 expression in the liver of PCSK9 KO mice. In order to assess whether the observed *ex vivo* effect of PCSK9 on CD81 in HuH7 cells would be the same *in vivo*, we analyzed the levels of CD81 in liver sections of *Pcsk9*^{-/-} mice that we recently reported (21). In Fig 7A, Western blot analysis showed that CD81 expression is substantially higher in mice that do not express PCSK9, which argues in favour of a downregulation of liver CD81 protein levels by PCSK9. Next, we analyzed the level of both CD81 and LDLR by immunofluorescence of 10 µm thick liver cryosections from two different mice for each genotype. The results revealed that the labelling of CD81 appeared noticeably higher over the basolateral membrane of hepatocytes, facing sinusoids, in the *Pcsk9*^{-/-} mice, as compared to wild type mice (Fig. 7B, middle panels). To further confirm that the effect of PCSK9 on CD81 is LDLR-independent, we analyzed the CD81 expression in the liver of double knockout mice lacking both PCSK9 and LDLR (21). Here also, the level of CD81 was distinctly higher in the liver of double KO mice when compared to wt animals, suggesting that PCSK9 downregulates CD81 independently from the LDLR (Fig. 7B, right panels). These experiments were also repeated with a different antibody against CD81 (EAT1, 1/20, Santa-Cruz), and generated similar results (*not shown*). As positive controls, we visualized LDLR in the same mice and noted that LDLR is highly expressed in the liver of *Pcsk9*^{-/-} mice

(Fig. 7B, left panels), as previously reported (21). We also showed that the liver immunoreactivity of the hepatocyte growth factor receptor (HGFR) and SR-BI, another HCV receptor, were not significantly different in wt, PCSK9 KO and in transgenic mice overexpressing PCSK9 in hepatocytes (PCSK9-Tg; Fig. S2) (21). These data extend the *ex vivo* effects of PCSK9 in hepatocytes towards the realm of its regulation of the level of hepatic CD81 *in vivo*.

DISCUSSION

PCSK9-wt, or its more active form PCSK9-ACE2, reduces the levels of membrane-bound receptor proteins such as LDLR, ApoER2 and VLDLR from the cell surface, due to their enhanced sorting towards the degradative pathway of endosomes/lysosomes (19, 24, 26). It should be noted that the enzymatic activity of PCSK9 is not required in this process, as PCSK9 remains inactive since it is tightly bound to its inhibitory pro-domain (13-16). Our data shows that expression of PCSK9 reduces cell surface levels of two alleged receptors of HCV, namely CD81 and LDLR (Fig. 2). In HuH7 cells, co-immunostaining for CD81 and PCSK9 clearly indicated that the appearance of PCSK9 coincides with the complete disappearance of CD81 in most expressing cells, and that only upon overexpression of soluble, but not membrane-bound, PCSK9 are neighbouring cells affected (Fig. 3), presumably by the secreted overexpressed PCSK9, which can act extracellularly (14). This result agrees with the notion that at physiological levels, endogenous PCSK9 mostly acts in an autocrine and/or paracrine fashion in liver hepatocytes (21). This is the first report demonstrating that PCSK9 can downregulate the cell surface expression of both LDLR and CD81. It is worth mentioning that the level of purified PCSK9 needed to significantly decrease the HCV titre is $\sim 7 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 5), a value well above some the reported circulating

levels of PCSK9 in human (0.05-0.6 $\mu\text{g/ml}$) (23), though using a different quantitation technique a mean value of plasma PCSK9 that is ~50 fold higher was also reported (31).

The depletion of CD81 and LDLR from HuH7 cells by PCSK9 had a direct effect on the cells susceptibility to infection by HCV (Fig. 4). It is interesting to note that the membrane-bound PCSK9-ACE2, which accumulates at the cell surface (24), was a more potent inhibitor of infection than the secreted PCSK9-wt (Fig. 4). To validate the fact that the inhibition of infection observed with the stable cell lines expressing PCSK9 can be transposed to susceptible HuH7 cells, we incubated naïve HuH7 cells with increasing doses of purified active soluble PCSK9. The results showed that soluble PCSK9, when added prior to infection was able to block infection in a dose-dependent manner (Fig. 5). It is tempting to speculate that, if transposed to human, these results suggest that elevated circulating plasma PCSK9 concentrations, and/or activity due to gain of function mutations, could in theory modulate liver susceptibility to HCV infection.

We next tried to determine if the presence of LDLR is required for the reduction of CD81 by PCSK9. Using an siRNA knockdown approach, we showed that the reduction of LDLR levels actually decreased, rather than increased, the level of CD81 in PCSK9-ACE2 cells, but had no effect on naïve HuH7 cells (Figs. 6B, C). This indicates that the PCSK9 effect on CD81 was not dependent on the presence of the LDLR. This conclusion was further strengthened by the immunocytochemical analysis of mouse liver double knockout for PCSK9 and LDLR (Fig. 7). Indeed, hepatic CD81 expression in those mice was markedly higher than in normal mice (Fig. 7B, right panels), suggesting that the *in vivo* regulation of CD81 by PCSK9 is independent of LDLR. We also believe that the downregulation of CD81 observed in *Pcsk9*^{-/-} mice (Fig. 7A) established the relevance of PCSK9 as an antiviral target that requires confirmation in human.

Recently, it has been demonstrated that the level of CD81 expression in HuH7 cells is central to infectivity and that even a moderate reduction in CD81 influences the cell susceptibility to infection by HCVcc (25, 32). The plasma concentration of PCSK9, which originates primarily from hepatocytes (21), greatly varies from one individual to another due, in part, to genetic factors (17, 33). As a result, during the acute phase of HCV infection, the likelihood of eliminating the virus could be greater in individuals with a higher concentration and/or activity of circulating PCSK9. Furthermore, a large scale community-based study demonstrated an association between HCV viremia and cholesterol levels in HCV patients (34). This correlation is in favour of our assumption suggesting that higher circulating levels of PCSK9 may correlate with lower viremia, a hypothesis that needs experimental validation. It must however be mentioned that high levels and/or activity of PCSK9 may result in hypercholesterolemia in view of the resulting lower hepatic levels of LDLR. Thus, a combination therapy aimed at upregulating PCSK9 and lowering LDL-cholesterol may be appropriate. This may include the combination of statins, known to upregulate PCSK9 (35) and downregulate LDL-cholesterol, and a mimic of the domain of PCSK9 that interacts with CD81.

In conclusion, this work demonstrates that hepatic PCSK9 can downregulate *in vitro* two of the putative *in vivo* liver receptors of HCV, namely CD81 and LDLR. The fate of other suspected or to be discovered *in vivo* HCV receptors or co-receptors is yet to be determined. Since higher plasma LDL-cholesterol (known to be positively regulated by PCSK9) in HCV patients correlate with better response to treatment (36), we postulate that the presumably elevated PCSK9 expression in some of these responders contributes to the elimination of the virus. Therefore, it would be quite informative to measure the levels of PCSK9 by ELISA in the serum of these high responders and to correlate these values with the degree of

responsiveness to antiviral drugs. Thus, measurements of plasma PCSK9 in infected individuals may guide future refinements of clinical and drug development strategies for HCV infections.

Accepted Preprint

REFERENCES

1. Thomson BJ, Finch RG. Hepatitis C virus infection. *Clinical Microbiology and Infection* 2005;11:86-94.
2. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003;362:2095-2100.
3. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962-973.
4. Diedrich G. How does hepatitis C virus enter cells? *FEBS J* 2006;273:3871-3885.
5. Bartosch B, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 2006;348:1-12.
6. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941.
7. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002;21:5017-5025.
8. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12766-12771.
9. Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset FL, Dragic T. The tight junction proteins claudin-1, -6 and -9 are entry cofactors for the Hepatitis C virus. *J Virol* 2008.
10. Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Control Hepatitis C Virus Entry and are Downregulated during Infection to Prevent Superinfection. *J Virol* 2008.

11. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, et al. Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science* 2005;309:623-626.
12. Gastaminza P, Kapadia SB, Chisari FV. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* 2006;80:11074-11081.
13. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:928-933.
14. Seidah NG, Prat A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med* 2007;85:685-696.
15. McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem* 2007;282:20799-20803.
16. Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, Asselin MC, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem* 2004;279:48865-48875.
17. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34:154-156.
18. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 2005;37:161-165.
19. Maxwell KN, Breslow JL. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7100-7105.

20. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, Hammer RE, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5374-5379.
21. Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J, Tremblay M, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 2008;48:646-654.
22. Benjannet S, Rhainds D, Hamelin J, Nassoury N, Seidah NG. The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol Chem* 2006;281:30561-30572.
23. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, Anderson NN, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest* 2006;116:2995-3005.
24. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergeron E, Marcinkiewicz J, Nassoury N, Mayer H, et al. The Proprotein Convertase PCSK9 Induces the Degradation of Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) and Its Closest Family Members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem* 2008;283:2363-2372.
25. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Miyamoto M, Kaga M, Barth H, et al. CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007;81:5036-5045.
26. Nassoury N, Blasiolo DA, Tebon Oler A, Benjannet S, Hamelin J, Poupon V, McPherson PS, et al. The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic* 2007;8:718-732.
27. Li J, Tumanut C, Gavigan JA, Huang WJ, Hampton EN, Tumanut R, Suen KF, et al. Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. *Biochem J* 2007;406:203-207.

28. Lavillette D, Bartosch B, Nourrisson D, Verney G, Cosset FL, Penin F, Pecheur EI. Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem* 2006;281:3909-3917.
29. Rocha-Perugini V, Montpellier C, Delgrange D, Wychowski C, Helle F, Pillez A, Drobecq H, et al. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* 2008;3:e1866.
30. Jamshad M, Rajesh S, Stamataki Z, McKeating JA, Dafforn T, Overduin M, Bill RM. Structural characterization of recombinant human CD81 produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2008;57:206-216.
31. Mayne J, Raymond A, Chaplin A, Cousins M, Kaefer N, Gyamera-Acheampong C, Seidah NG, et al. Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:451-456.
32. Koutsoudakis G, Herrmann E, Kallis S, Bartenschlager R, Pietschmann T. The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol* 2007;81:588-598.
33. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin NV, Horton JD, Cohen JC, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet* 2006;79:514-523.
34. Dai CY, Chuang WL, Ho CK, Hsieh MY, Huang JF, Lee LP, Hou NJ, et al. Associations between hepatitis C viremia and low serum triglyceride and cholesterol levels: a community-based study. *J Hepatol* 2008;49:9-16.
35. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, Prat A. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1454-1459.

36. Gopal K, Johnson TC, Gopal S, Walfish A, Bang CT, Suwandhi P, Pena-Sahdala HN, et al. Correlation between beta-lipoprotein levels and outcome of hepatitis C treatment. *Hepatology* 2006;44:335-340.

Accepted Preprint

FIGURES LEGENDS

FIGURE 1. Stable PCSK9-wt and PCSK9-ACE2 expression in HuH7 cells. (A) Recombinant proteins used: sp: signal peptide; pro: prosegment; CHRD: cysteine and histidine-rich domain; TM: transmembrane domain; CT: cytoplasmic tail. (B) Cell sorting of PCSK9-ACE2 positive cells, whereupon the ~10% higher expressors were collected. (C) Western blots showing the levels of stably expressed PCSK9-wt, PCSK9-ACE2 or ACE2 in HuH7 cells. (D) FACS analysis of PCSK9-wt and PCSK9-ACE2 cell surface expression on HuH7 cells. (E) Immunofluorescence confocal analysis of PCSK9-wt and PCSK9-ACE2 protein in HuH7 cells. Arrows point to the reticular or cell surface expression of PCSK9 or PCSK9-ACE2, respectively.

FIGURE 2. The cell surface expression of the LDLR and CD81 is markedly decreased in HuH7 cells stably expressing PCSK9-wt and PCSK9-ACE2. Cell surface expression of LDLR and CD81 was analyzed by FACS using monoclonal antibodies for the detection of LDLR and CD81. These are representative data of at least three independent experiments.

FIGURE 3. PCSK9 expression induced the disappearance of CD81 from HuH7 cells. PCSK9 and CD81 expression was analyzed by immunocytochemistry on a confocal microscope. HuH7 cells were transiently transfected with cDNAs coding for an empty vector, PCSK9-wt, PCSK9-ACE2 or PCSK9-Lamp1. HuH7 cells expressing (A,B,C) pIRES plasmid, (D,E,F) PCSK9-wt, (G,H,I) PCSK9-ACE2, and (J,K,L) PCSK9-Lamp1.

FIGURE 4. HuH7 cells expressing PCSK9 are resistant to HCV JFH1 infection. (A) Immunofluorescence showing foci of infected cells at 72h post-infection. Colonies were visualized by immunostaining of the NS5A protein and the nuclei were stained with DAPI. (B)

Western blotting showing the HCV NS5A protein and β -actin in the infected cells (15-days PI). (C) Quantification of the remaining NS5A protein expression in the infected HuH7 cells, calculated from the blot in B. Infected normal HuH7 cells were arbitrary set as 100% and the NS5A expression level were normalized to the chemiluminescence of β -actin. (D) Intracellular JFH-1 RNA at 15-days PI was calculated by qPCR. Input RNAs were normalized to RNA 18S.

FIGURE 5. Soluble purified PCSK9 inhibits HCV JFH1 infection in HuH7 cells. HuH7 cells were plated and treated with specified amounts of purified human PCSK9 (0 to 15 μ g/ml) for 4h prior to infection with J6/JFH1 in the presence PCSK9. At 3-days PI, HCV NS5A protein was stained with a rabbit polyclonal antibody. The activity of soluble PCSK9 was calculated from the colony forming units (CFU) observed in the treated HuH7 cells as compared to mock control. These are representative data of two independent experiments performed in duplicate. (Inset) Purity of soluble recombinant PCSK9 (Coomassie blue).

FIGURE 6. PCSK9 blocks HCVpp infection and CD81 modulation by PCSK9 is LDLR independent. (A) HuH7 or stable HuH7 ACE2 and HuH7 PCSK9-ACE2 cells were infected with HCVpp or VSVpp. Luciferase activity (RLU) was calculated 72h post-infection, and pseudoparticles infectivity was calculated relative to the infection of HuH7 cells by HCVpp, arbitrarily set at 100%. VSVpp infections were used as positive controls. The values are the average of five independent experiments. (B) HuH7 cells were transfected in duplicate with a non-specific siRNA as negative control (NC) or siRNAs directed against LDLR (siRNA-A and siRNA-B). Expression was verified 48h post-transfection by Western blotting. (C) HuH7 and PCSK9-ACE2 cells were transfected with siRNA-NC or siRNA-A. Expression of CD81 was

verified 48h post-transfection by Western blotting. Percentages represent the remaining expression of the proteins after normalization to β -actin.

FIGURE 7. CD81 expression in the liver of *Pcsk9* and *Ldlr* KO mice. (A) Representative set of data from two independent experiments for the immunodetection of CD81 in liver extracts of wild-type or *PCSK9*^{-/-} mice. The CD81 expression was normalized using GAPDH as control. (B) LDLR and CD81 expression were analyzed by immunohistochemistry (green) in liver cryosections of wild type, single KO [*Pcsk9*^{-/-}] and double KO [*Pcsk9*^{-/-} *Ldlr*^{-/-}] mice. For each condition, at least 10 fields were compared. These experiments were repeated 2 times. Nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue). Bars = 20 μ m.

We appreciate the gift of JFH1 and J6/JFH1 (Dr. Takaji Wakita (NIID, Japan) and Dr. Ralf Bartenschlager (Johannes-Gutenberg University, Germany), respectively. We thank Josée Hamelin and Edwidge Marcinkiewicz for technical assistance and Brigitte Mary for secretarial help. We thank Drs. Rex Parker and Franck Duclos (BMS, USA) for purified PCSK9 and Dr. Francois-Loïc Cosset (France) for pseudoparticle constructs.

Accepted Preprint

Accepted Article

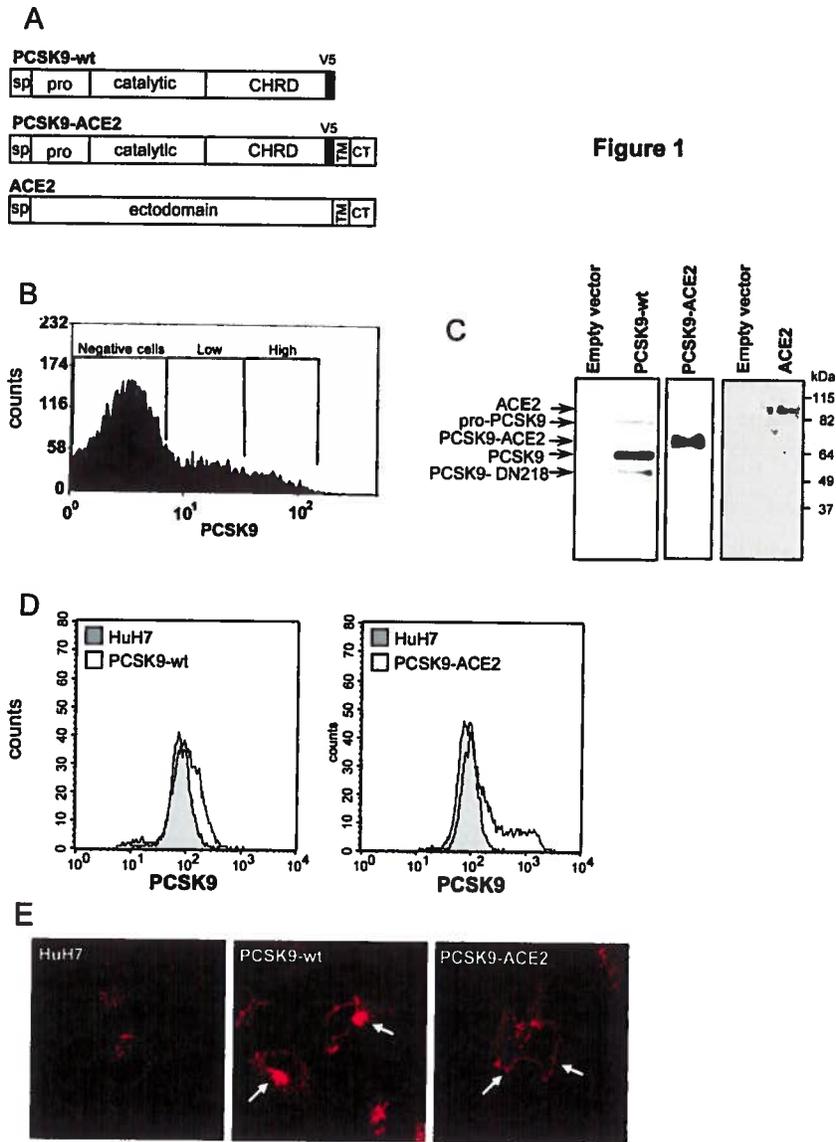
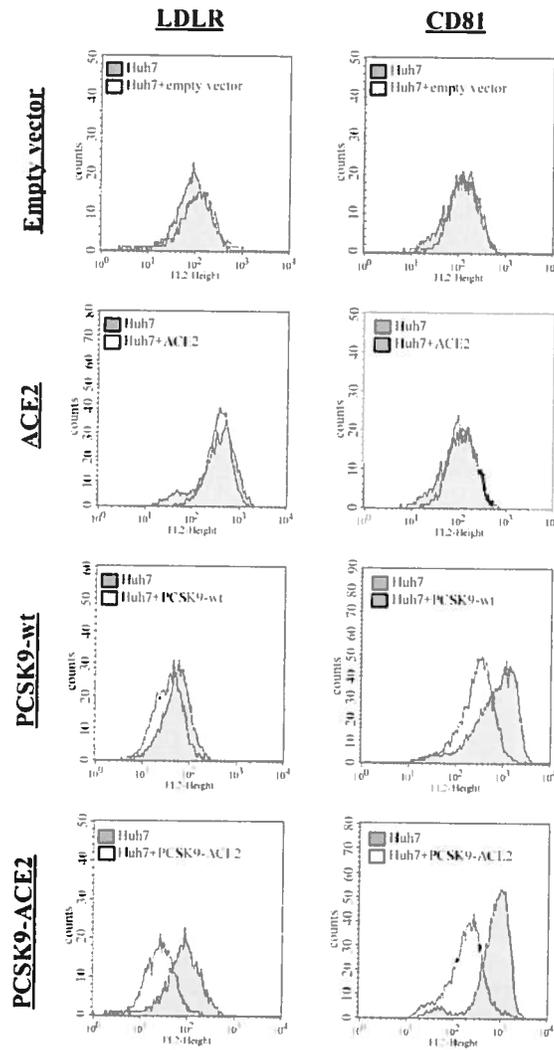


Figure 1

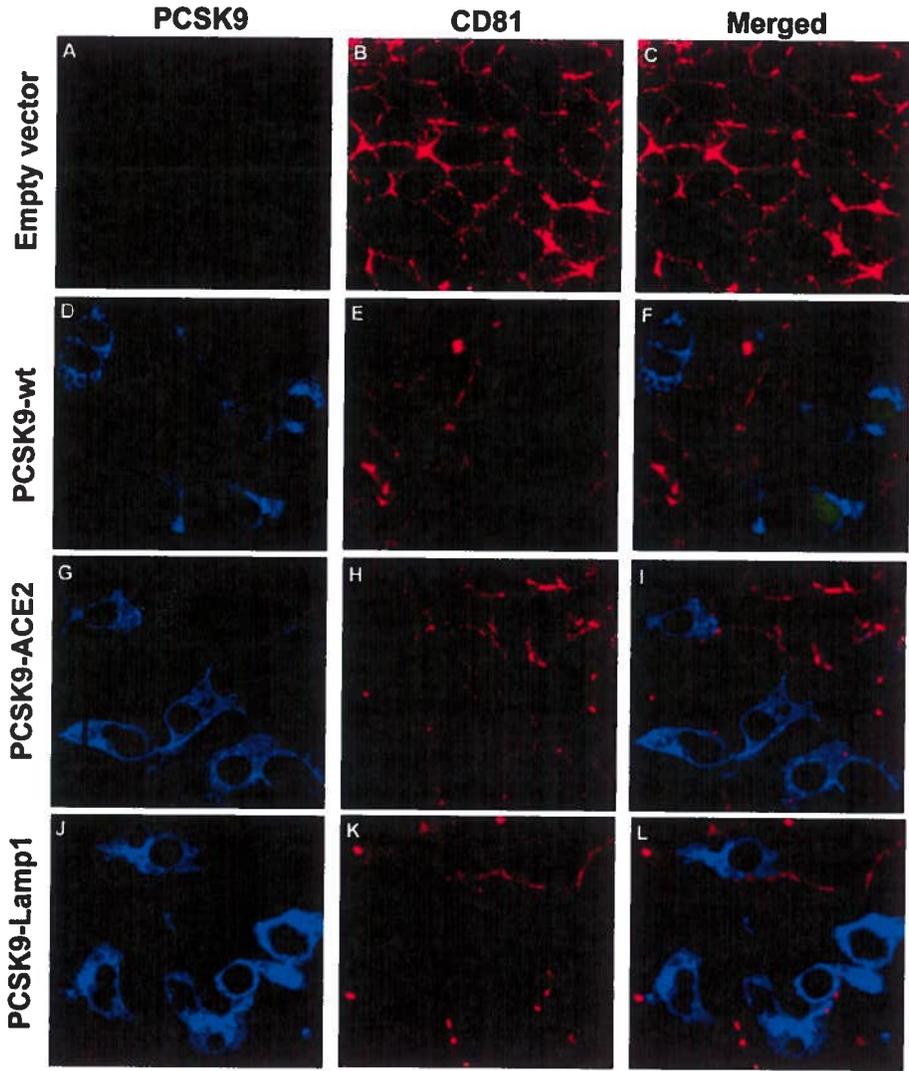
101x138mm (300 x 300 DPI)

Figure 2



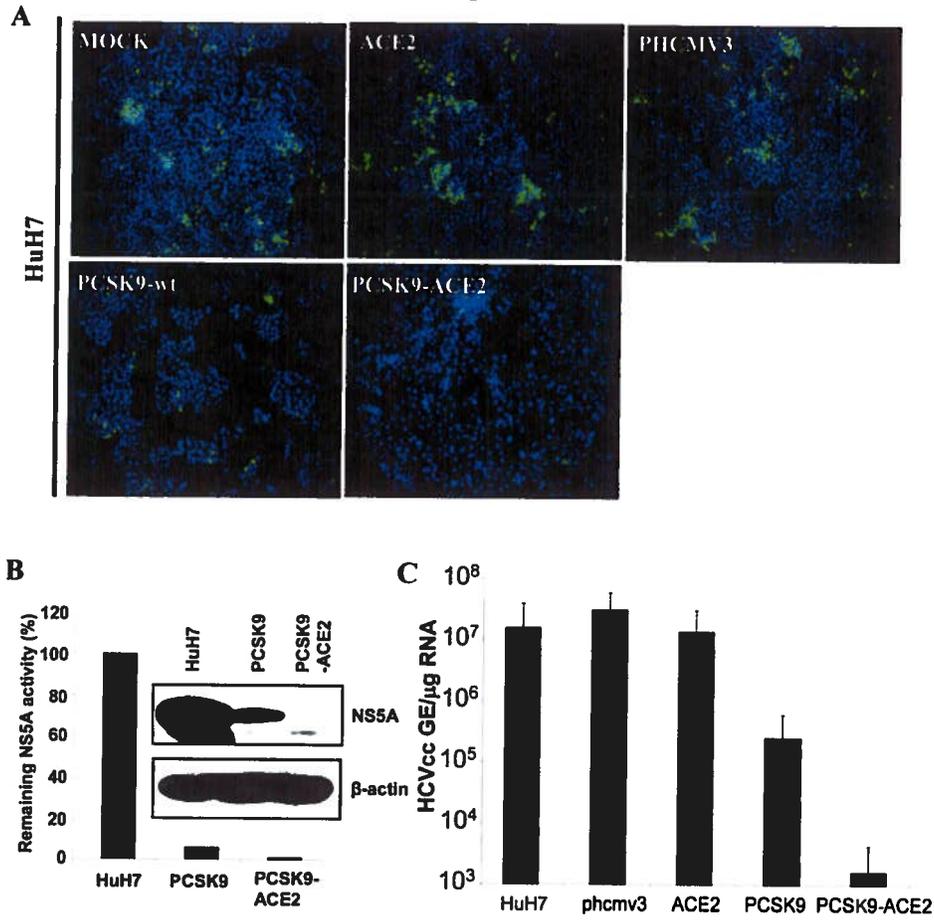
100x195mm (300 x 300 DPI)

Figure 3



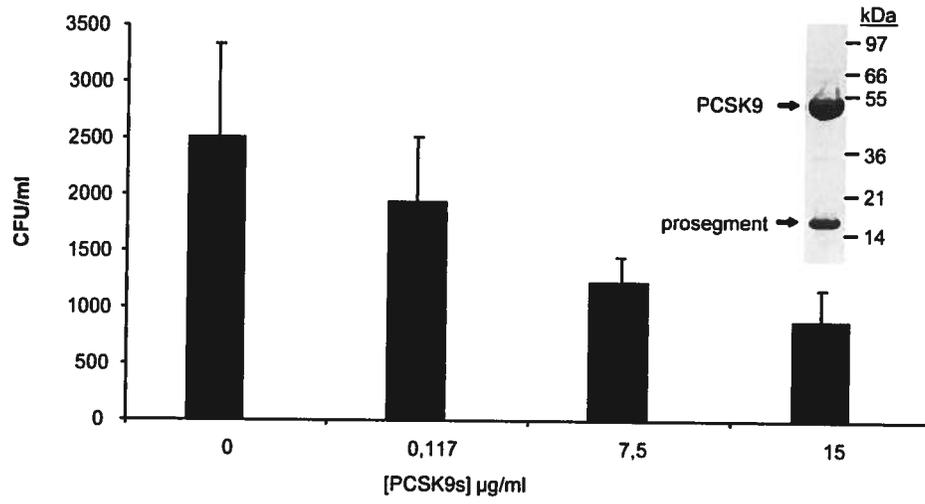
161x200mm (300 x 300 DPI)

Figure 4

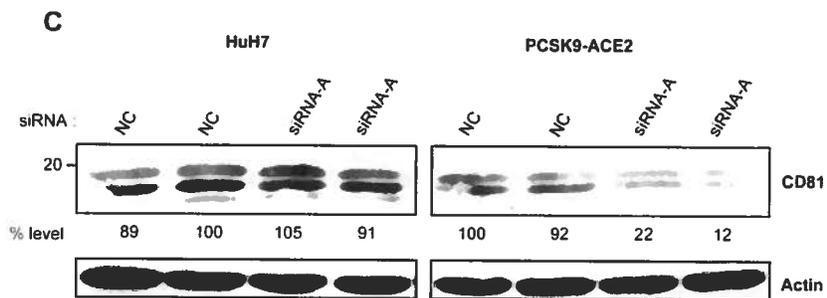
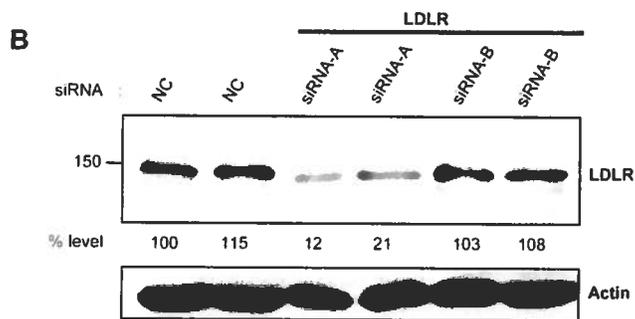
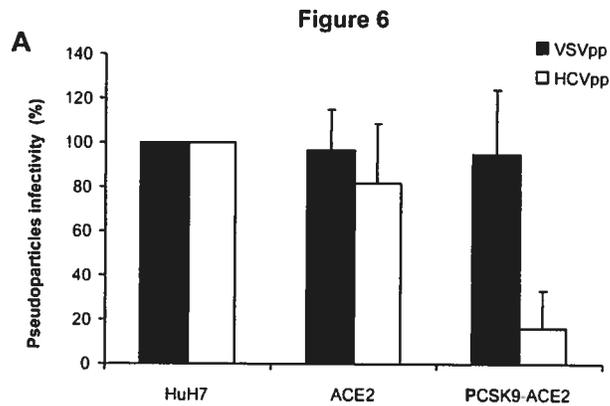


183x188mm (300 x 300 DPI)

Figure 5



167x103mm (300 x 300 DPI)



172x237mm (300 x 300 DPI)

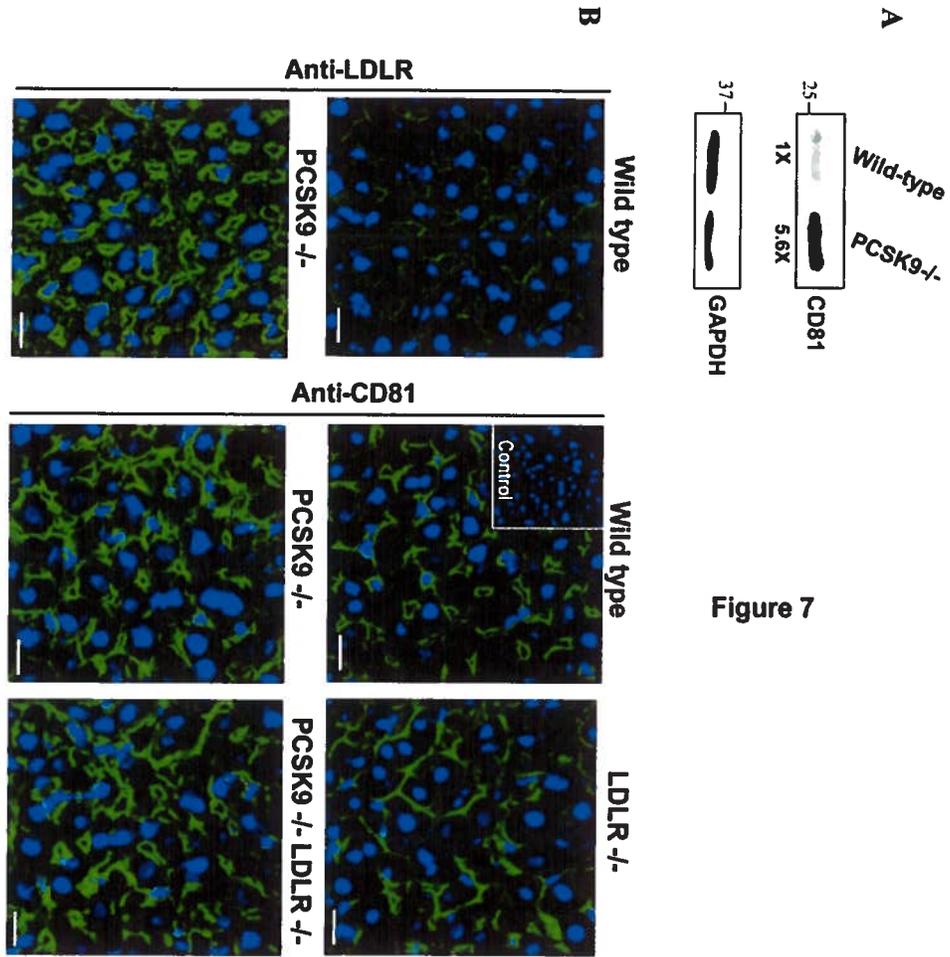


Figure 7

178x181mm (300 x 300 DPI)

Preprint
Accep

Supplementary materials**EXPERIMENTAL PROCEDURES**

Cells and Virus HuH7 and HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium high glucose (DMEM) (Invitrogen) supplemented with 5 mM sodium pyruvate, 100 U of penicillin/ml, 100 µg of streptomycin/ml, and 10% fetal calf serum. All cells were grown at 37°C in 5% CO₂. The HCVcc JFH-1 and J6/JFH1 were obtained from Dr T. Wakita and R. Bartenschlager, respectively.

Plasmids and Stable Cell Lines HuH7 cell populations expressing PCSK9, PCSK9-TM-CT-ACE2 (PCSK9-ACE2), PCSK9-TM-CT-Lamp1 (PCSK9-Lamp1), ACE2 or the empty phCMV3 vector (Invitrogen) were generated as described (24). HuH7 cells were transfected with 2 µg of the corresponding plasmid using lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), as described by the manufacturer. At 24h post-transfection, G418 (800 µg/ml) was added to the cultured media for stable selection of transfected cells. Once the selection was completed, PCSK9 and PCSK9-ACE2 cells were sorted by FACS using a rabbit polyclonal anti-PCSK9 antibody (Ab1-hPC9) and the ~10% higher expressors were isolated and used for further experimentations. All stable cell lines were cultured under selective pressure by the addition of 600 µg/ml of G418 to the media.

Quantitative RT-PCR (Taqman). Total cellular RNA was extracted and purified with Trizol as described by the manufacturer (Invitrogen). The cDNAs were prepared from 250 ng of total RNA. Briefly, RNAs were incubated for 3 min at 70°C then cooled on ice for 2 min before the addition of 4 µl of RT-Buffer 5X (Invitrogen), 2 µl DTT (0.1 M), 1 µl random primer p(dN6) (100 ng/µl), 1 µl dNTP (20 mM), 20 U of RNAsin and 100 U of

MMLV reverse-transcriptase. Samples were incubated for 10 min at 25°C and 1h at 37°C. To inactivate the MMLV, samples were incubated 15 min at 70°C and the cDNAs diluted to a final volume of 200 µl with Rnase-free water. The primers used for amplification were: 5'UTR-R 5'-GAGTGGGTTTATCCAAGAAAG-3' and 5'UTR-F: 5'-TCTGCGGAACCGGTGAGT-3'. The mixture consisted of 2.5 µl of cDNA in a final volume of 25 µl of reaction mixture containing 8.6 µl of H₂O, 0.5 µl of probe FAM-UTR (12,5pmole/µl) 5'-CGGAATTGCCGGAAGACTG-3', 0.25 µl (90 pmole/µl) of each HCV primer. For internal control, the 18S Ribosomal RNA Kit was used as suggested by the manufacturer (Applied Biosystem). The mixture was completed with 12.5 µl of the Taqman Universal Master Mix 2X (Applied Biosystem) and the amplification was performed as suggested by the manufacturer in a Rotor-Gene RG-3000 (Corbet Research).

Flow Cytometry. Cell surface expression of PCSK9 and CD81 was monitored following recovery of the cells using versene or trypsin, 0.25% EDTA (Invitrogen), respectively. Approximately 1×10^6 cells were fixed in PBS containing 4% formaldehyde for 10 min and blocked in PBS 3% FBS for 30 min at 4°C. Cells were stained for 1h at 4°C with anti-PCSK9 (Ab1-hPC9) (27) or an anti-CD81 (Santa Cruz Biotechnology) antibody at a dilution of 1:200 and 1 µg/ml, respectively, in PBS 3% FBS. Cells were washed twice in PBS and incubated for 30 min at 4°C with a rabbit-polyclonal-Alexa 488 antibody or mouse-specific secondary antibodies conjugated with phycoerythrin (PE) (1:1000) (Jackson ImmunoResearch) in PBS 3% FBS, respectively. For detection of SR-BI, transferrin receptor (CD71), Claudin-1 (CLDN1) and LDLR at the cell surface, the cells were re-suspended in Versene™ and treated as above, except that the primary antibody was an rabbit anti-SR-BI (1 µg/ml) (Novus Bio), an mouse anti-LDLR (C7; 1 µg/ml)

(Santa Cruz Biotechnology), an FITC-coupled mouse anti-human CD71 (BD pharmagen), an mouse anti-human CLDN1 (1 µg/ml; Abnova) and the secondary antibody was a goat anti-rabbit-Alexa-488 (Molecular Probe) (1:1000) or an anti-mouse PE-conjugated (1:1000) (Jackson ImmunoResearch), respectively. All samples were analyzed immediately using a FACSCalibur™.

Indirect Immunofluorescence. HuH7 cells were seeded on cover glass (2×10^4 cells per cover glass) and infected 24h later with a concentrated virus J6/JFH1 (MOI 0.1). At 72h post-infection, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Staining of HCV NS5A was performed using polyclonal anti-NS5A (obtained from O Nicolas, Virochem) antibody for 1h (dilution 1:200) in a solution of PBS containing 3% BSA, 10% FBS and 10% Triton™ X-100. Antibodies were washed 4X in PBS and bound antibodies were detected by incubation for 1h with anti-rabbit goat Alexa 488 antibody at a dilution of 1:500. Unbound antibodies were washed 4X with PBS. The cells were then incubated with DAPI (dilution 1:36000) to stain the nuclei in blue. Immunofluorescence analysis was performed by counting manually the foci of infection (green fluorescence) with a Nikon microscope TE2000. Indirect immunofluorescence of PCSK9 and CD81 antigens was performed using a PCSK9 antibody (Ab1-hPC9) (26) and a CD81 antibody, used at dilutions of 1:2000 and 1:200, respectively.

Western Blotting. The cells were seeded on 6-well plate at a density of 4×10^4 per well, 24h before infection. Cells were then infected with HCVcc J6/JFH1 (MOI 0.1) for 12 days and then homogenized in RIPA buffer. Proteins homogenate of 2×10^5 cells were heated for 4 min at 95°C before separation by SDS-PAGE. The resolved proteins were then electrophoretically transferred to an Immuno-Blot PVDF membrane for protein blotting (Bio-Rad) for 45 min. Non-specific binding sites were blocked for 1h in PBS-5% skim

milk and the membrane stained for 1h. The antibodies used were rabbit polyclonal anti-NS5A (1:2000, obtained from O. Nicolas, Virochem), rabbit polyclonal anti-PCSK9 (1:2000, Ab1-hPC9) (26) goat polyclonal anti-ACE2 (1:200) (C-18 SantaCruz Biotechnology). After incubation with the primary antibody, the membranes were washed 4X in PBS-0.1% Tween-20. Bound antibodies were detected by incubation for 45 min with a goat anti-rabbit HRP antibody (1:10000, Jackson Immunosearch) or a donkey anti-goat HRP antibody (1:10000, Jackson Immunosearch). The signals were developed with a SuperSignal™ West Pico chemiluminescent substrate (Pierce). The chemiluminescence of the NS5A was normalized to the internal control, β -actin, and recorded in real-time using the Chemigenius™ gel documentation system (Syngene).

PCSK9 Inhibition Assay. HuH7 cells were seeded on a 96 well plate at a density of 8×10^3 cells per well 24h before the addition of a serial dilution of purified human PCSK9 (range from 0 to 15 $\mu\text{g/ml}$) (a generous gift from R. Parker and F.J. Duclos, Bristol Myers Squibb, NJ). The cells were then infected with 50 μl of JFH-1 infectious supernatant after 6h of incubation with graded amounts of purified PCSK9. Fresh PCSK9 and media were added daily and the infection was stopped at 72h post-infection by fixing the cells in 4% formaldehyde in PBS. The cells were then immunostained with an NS5A antibody, as described above, and NS5A positive foci were visualized with a Nikon microscope TE2000.

HCV pseudoparticles production. To generate HCV pseudoparticles, HEK293T cells were transfected with expression vectors encoding E1E2 HCV glycoprotein and VSV pseudo-particles, generated by transfection of HEK293T cells with an expression vector encoding the glycoprotein of vesicular stomatitis virus. HEK293T cells were plated the

day before transfection in a medium without antibiotic at a density of 2.5×10^6 cells in 10 cm plates. The next day, the gag-pol packaging construct (8 μg), the luciferase vector (8.1 μg) and the glycoprotein-expressing construct (3 μg) were transfected in HEK293T cells using a calcium phosphate transfection protocol (Promega transfection protocol) and incubated overnight. The next day, the media were replaced by a complete medium and 24h later, they were filtered on a 0.45 μm membrane and stored at -80°C . For VSVpp generation, the same protocol was used except that 8 μg of gag-pol, 8.1 μg of luciferase and 2.7 μg of VSVG were transfected.

Pseudotyped Virus Infectivity Assays. HuH7 cells were seeded at a density of 4×10^4 cells/well in a 24-well plate and cultured overnight. The next day 500 μl of infectious HCVpp or VSVpp were added to the wells and the plate incubated overnight. The next day, the medium was replaced with fresh complete DMEM for 72h. Cells were rinsed in PBS and trypsinized. Detached cells were centrifuged out and the pellet was stored at -80°C . Luciferase activity was determined using a Luciferase assay system (Promega).

LDLR siRNA Assay. For siRNA transfection experiments, HuH7 and HuH7 PCSK9-ACE2 cells were seeded at 1×10^5 cells/well in 24-well plates the day before. LDLR siRNAs (s224006; siRNA-A and s224007; siRNA-B) were purchased from Ambion and transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. As negative control, a non-specific siRNA was used. Cells were trypsinized 48h after transfection and LDLR expression was analyzed by Western blotting using a chicken polyclonal anti-LDLR antibody (1:3000) (Abcam) and a goat anti-chicken HRP secondary antibody (1:10000) (Abcam).

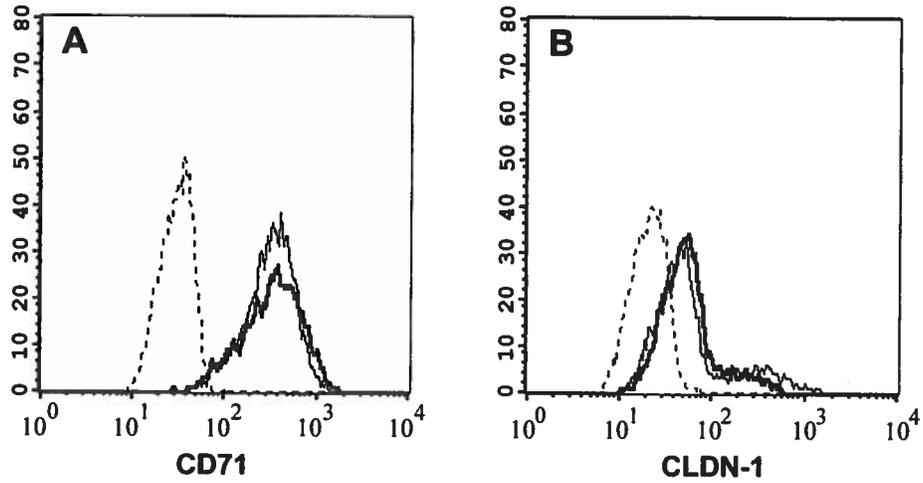
CD81 expression in mice. For CD81 visualization, 50 μ g of mice liver homogenate were run on SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using a hamster anti-CD81 antibody (EAT-2) (1/100, Santa Cruz) and a goat anti-hamster HRP (1/10 000, Jackson Laboratories). Bands were detected by chemiluminescence as described above and quantified using an Alphamager 3400 (AlphaInnotech). For immunohistochemistry, frozen mouse liver sections were fixed and permeabilized in MeOH:acetone (1:1) for 3 min at -20°C. The cells were washed 3X for 2 min in PBS and blocked in 1% BSA for 30 min. CD81 was labelled with anti-CD81 EAT2 antibody (1:20) overnight at 4°C. CD81 immunoreactivity was revealed with a goat anti-hamster IgG-FITC (1:50 eBioscience). Nuclei were stained with TO-PRO-3 Marker (blue; Invitrogen). For the detection of LDLR, we used a goat anti-mLDLR (1:100; R&D systems) and a donkey anti-goat-Alexa 488 (Invitrogen). As control, the omission of the primary antibody demonstrated the specificity of the labelling.

FIGURE LEGEND

SUPPL. FIGURE 1. The cell surface expression of cellular receptors on HuH7 cells stably expressing PCSK9-ACE2. Cell surface expression of (A) the transferring receptor (CD71) and (B) CLDN-1 was analysed by FACS. Isotypic control: dash line; HuH7: thin line; PCSK9-ACE2: bold line. These are representative data of at least two experiments.

SUPPL. FIGURE 2. Immunohistochemistry of mouse liver. Liver cryosections fixed in MeOH:Acetone were incubated either with a rabbit anti-HGFR (Met (C-12) Santa-Cruz, dilution 1:20) or a rabbit anti-SR-BI (Novus Biologicals; dilution 1:200) and revealed with an anti-rabbit IgG-Alexa 555 (red). Nuclei were labeled with TO-PRO-3 (blue).

Figure S1

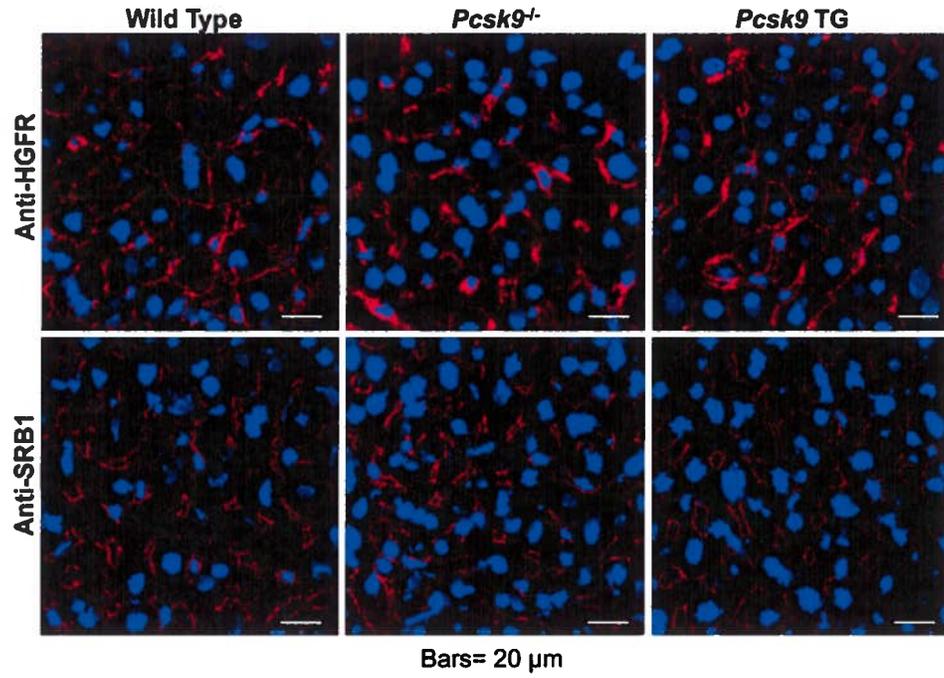


130x80mm (300 x 300 DPI)

Accepted Preprint

Accepte

Figure S2



243x183mm (300 x 300 DPI)

Chapitre 3

Discussion générale et conclusion

Discussion

Pour plusieurs années, l'absence d'un système de culture cellulaire a nui à l'avancement de la recherche fondamentale et appliquée sur le VHC. Depuis peu, l'établissement d'un virus adapté à la culture cellulaire (JFH1) reproduisant toutes les étapes de l'infection a été une percée majeure dans le domaine. Récemment, l'étude de l'entrée du virus a progressé, mais cette étape du cycle de réplication demeure toujours méconnue. Plusieurs études ont proposé des récepteurs et des corécepteurs participants à cette étape, mais aucun mécanisme précis n'a encore été identifié. Parmi ceux-ci, on retrouve le SR-BI, les Claudin 1,6 et 9, les GAG, le CD81 et le LDLR (Diedrich 2006). Des études *in vitro* utilisant des cellules Huh7 ont montré que le CD81, la CLDN-1, et à une moins grande incidence le SR-BI, sont les principaux récepteurs pour l'entrée virale. Quant à lui, l'implication du LDLR demeure controversée. Toutefois, une étude récente laisse suggérer qu'il aurait un rôle beaucoup plus important que le laissent croire les études *in vitro*. En effet, l'étude propose que le LDLR est déterminant pour l'infection des hépatocytes primaires par le VHC dérivant du sérum humain infecté (Molina *et al.* 2007). D'autres travaux ont démontré une forte corrélation entre le niveau d'expression du LDLR et le titre viral chez une cohorte de patients chroniquement infectés (Petit *et al.* 2007). Ils ont montré que l'expression du LDLR à la surface des cellules mononuclées du sang était significativement associée au LDL-c et au titre viral. Ces études et le fait que le VHC est associé à des particules de LDL et VLDL dans le sang appuient fortement le LDLR comme joueur capital dans l'infection.

Encore aujourd'hui, il n'existe aucun mécanisme capable d'expliquer clairement la raison pour laquelle seuls les hépatocytes sont permissifs au VHC. En effet, l'expression exogène dans des cellules non permissives de tous les récepteurs suggérés ne renverse pas le phénomène de non-permissivité. De plus, l'identification précise du mécanisme d'entrée est d'autant plus difficile dû aux différentes formes existantes du VHC (libre, LVP, etc.). Il est fort possible que plus d'une voie d'entrée soit empruntée. Pour mieux comprendre la progression de l'infection du VHC, il est essentiel d'éclaircir les concepts du processus de pénétration du VHC dans la cellule.

Dans le but d'approfondir les connaissances sur le rôle du LDLR dans l'infection par le VHC, nous avons utilisé une nouvelle approche qui consiste à enlever de la surface cellulaire le LDLR en utilisant une forme plus active de la proprotéine convertase PCSK9 (PCSK9-ACE). De plus, nous avons étudié l'effet de différentes constructions de PCSK9 sur les niveaux d'expression des autres récepteurs importants pour l'entrée du VHC, soit le CD81 et le SR-BI.

Nos travaux sont les premiers à démontrer que PCSK9-wt, mais surtout la forme plus active de PCSK9, soit PCSK9-ACE2, peuvent réguler à la baisse non seulement l'expression du LDLR, mais également du CD81 de la surface des hépatocytes (figure 2). En conséquence, l'infection par le virus de l'hépatite C est inhibée (figure 4). Surprenant, l'expression transitoire de PCSK9 dans une cellule est directement corrélée à la disparition du CD81 de la surface de cette même cellule, mais pas chez les cellules voisines (figure 3). L'ajout de PCSK9 soluble au milieu de culture a également entraîné une inhibition de l'infection ce qui a permis de confirmer que l'effet observé était bien dû au PCSK9 et non pas à un défaut de la cellule apparu lors de la sélection (figure 5). Par l'utilisation des pseudoparticules (VHCpp), nous avons validé le rôle essentiel de CD81 dans l'infection et renforcé l'hypothèse de l'implication du LDLR dans l'entrée du VHC (figure 6). En effet, les VHCpp sont produites dans les cellules HEK293 et sont dépourvues de lipoprotéines à leur surface, ce qui entrave l'interaction avec le LDLR (Diedrich 2006). Nos travaux avec les VHCpp proposent que l'inhibition de l'infection est principalement médiée par CD81, car ils peuvent facilement infecter les cellules contrôles, mais pas les cellules exprimant PCSK9 (figure 6A). Suite à cette observation, nous avons exploré le type de relation existante entre le LDLR et le CD81. Nos résultats préliminaires suggèrent que la réduction de l'expression de CD81 par PCSK9 est un phénomène indépendant de la présence du LDLR à la surface cellulaire (figure 6B-C).

À cette étape de l'étude, nous étions convaincues que PCSK9 pouvait bloquer l'infection par le VHC en affectant le niveau de CD81 à la surface cellulaire, et ce, indépendamment du LDLR. Pour renforcer l'hypothèse que PCSK9 peut également moduler l'infection *in*

vivo par le même mécanisme qu'*in vitro*, nous avons validé le phénomène chez des souris (figure 7). Les résultats montrent que dans des tissus de foie provenant de souris dépourvues en PCSK9 et en LDLR, l'expression de CD81 est significativement plus élevée que chez les souris normales. Pour la première fois, nos recherches indiquent que PCSK9 empêche l'infection *in vitro* par le VHC et que la régulation du CD81 hépatique par PCSK9 survient également *in vivo*. Il reste à savoir si PCSK9 module également l'infection par le VHC *in vivo*.

Implication du CD81 dans l'infection

À ce jour, aucun agent anti-VHC spécifique n'a été commercialisé. Les thérapies standards actuellement utilisées augmentent la réponse immunitaire naturelle envers le virus tandis que les nouveaux concepts thérapeutiques ciblent directement (i) l'ARN viral (nucléotides antisens, ARNi) (ii) les enzymes virales (inhibiteurs de l'activité protéase de NS3 et de la polymérase NS5B) ou (iii) influencent les interactions hôte-virus (inhibiteur de la cyclophiline B, inhibiteur de l'entrée virale) (Parfieniuk *et al.* 2007). En effet, bloquer l'entrée du virus dans la cellule, étape critique au rendement de l'infection, soit par des anticorps neutralisants ou des inhibiteurs spécifiques serait efficace (Davis *et al.* 2007). Par exemple, on peut penser à une drogue antivirale ciblant les récepteurs importants pour l'entrée du virus. À cet égard, le récepteur CD81 semble être le meilleur sujet. En effet, l'expression à la surface cellulaire de CD81 est essentielle à l'infection (Diedrich 2006). Zhang *et al.* ont démontré que la transfection de CD81 dans les cellules HepG2 rend les cellules permissives au VHC (Zhang *et al.* 2004). De plus, ils ont prouvé l'importance du CD81 en démontrant par ARNi qu'une diminution de 70 % de l'expression du CD81 est suffisante à l'inhibition totale de l'infection. Dans le même ordre d'idée, des anticorps contre CD81 inhibent l'infection du VHC d'une manière dose-dépendante (Bertaux et Dragic 2006). Le niveau d'expression de CD81 est donc déterminant pour la permissivité des cellules au VHC. Une drogue bloquant le CD81 ou un agent diminuant le niveau d'expression de CD81 serait efficace pour du moins, inhiber significativement l'infection. Nos résultats vont dans ce sens et indiquent que PCSK9 peut moduler efficacement CD81 à la surface des hépatocytes.

Relation entre PCSK9, CD81 et le VHC

L'association des proprotéines convertases, par exemple la furine, avec la maturation virale est déjà bien décrite pour plusieurs virus incluant le VIH, le SARS, le MHV, l'Influenza et le virus Ebola. Dans ces exemples, la furine a la capacité de cliver les glycoprotéines de surface des virus qui deviennent alors biologiquement actives. Pour la première fois, notre étude montre que la proprotéine convertase PCSK9 a un effet antiviral et jamais auparavant une étude n'avait rapporté un effet de PCSK9 sur un virus. Nos recherches indiquent que PCSK9 inhibe l'infection par le VHC non pas par l'interaction avec le virus, mais par la réduction de deux de ses récepteurs cellulaires, soient le LDLR et le CD81, et ce, *in vitro* et *in vivo*.

Dans un premier temps, il est essentiel de mentionner que c'est la première fois qu'une étude montre que PCSK9 a un effet sur CD81. On connaissait seulement la capacité de PCSK9 à moduler le niveau du LDLR et de ses homologues apoER2 et VLDLR (Poirier *et al.* 2008). Les mécanismes qui mènent ces trois récepteurs à la dégradation demeurent toutefois méconnus, mais il est évident que PCSK9 ne clive directement aucune de ces cibles. En effet, on ne connaît aucun substrat à PCSK9. C'est suite à l'analyse des séquences d'acides aminés du LDLR, de ApoER2, du VLDLR et de CD81 que nous avons observé l'existence d'une homologie entre les quatre récepteurs, tout près du site de liaison connue entre le LDLR et PCSK9. Cette homologie propose l'existence d'une interaction directe entre PCSK9 et CD81. Cette probabilité est soutenue par le fait que l'inhibition de l'expression de CD81 est un phénomène indépendant du LDLR. Évidemment, nous avons exclu l'option que le LDLR soit internalisé en concomitance avec le CD81. Toutefois, la découverte de l'interaction entre PCSK9 et CD81 renforce l'hypothèse que PCSK9 ait un partenariat avec un ou plusieurs facteurs tissulaires spécifiques pour mener ses cibles vers la dégradation. Une étude appuyant cette hypothèse a été faite par Seidah *et al.* (Poirier *et al.* 2008). Ils ont observé qu'une incubation de PCSK9 soluble sur une longue période avec des cellules COS-1 mène à une association entre PCSK9 et la cellule, mais ne résulte pas en la dégradation endogène du LDLR. Ces résultats suggèrent que PCSK9 requiert peut-être un autre facteur pour

dégrader le LDLR. D'autres études laissent croire qu'advenant l'existence d'un partenaire, ce dernier ne serait pas sécrété dans le plasma conjointement avec PCSK9, mais serait probablement un agent exprimé à la surface cellulaire ou un facteur endogène (Holla *et al.* 2007). Notre étude suggère que le niveau d'expression de CD81 est réduit en présence de PCSK9 et qu'il ne dépend pas de la présence du LDLR et le contraire est aussi vrai. Des travaux précédents montrent que la dégradation du LDLR est indépendante du CD81. En effet, chez des cellules déplétées en CD81 (HepG2), PCSK9 a le même effet sur le LDLR.

Le niveau d'expression du récepteur CD81 est critique à l'infection. Une légère diminution de son expression résulte en une forte inhibition virale (Zhang *et al.* 2004). En fait, le développement d'antiviraux affectant l'expression de CD81 est un domaine prometteur. La découverte que PCSK9 réduit le niveau de CD81 à la surface cellulaire est une percée majeure à ce sujet. Elle ouvre les portes de la recherche sur le développement d'une drogue imitant l'interaction entre PCSK9 et CD81 qui aurait le potentiel de limiter l'infection et même d'éliminer complètement le virus chez un individu infecté. Ces spéculations sont appuyées par nos expériences réalisées *in vivo*. Il est certain que la perte d'expression de CD81 interfère significativement dans l'efficacité du VHC à pénétrer l'hépatocyte. Nous suggérons que l'effet antiviral de PCSK9 pourrait être observé avec d'autres virus qui requièrent CD81 pour leur réplication. Par exemple, il a été démontré que l'assemblage du VIH prend place sur la membrane cellulaire à un site riche en tétraspanines, particulièrement en CD81 (Deneka *et al.* 2007). Bien que le site d'assemblage du virus diffère pour les macrophages et les cellules T, l'expression de CD81 est requise dans les deux cas et il est possible que la réplication du VIH puisse être affecté par la concentration de PCSK9 en circulation dans le sang.

La concentration de PCSK9 circulant dans le plasma varie grandement entre individus en partie dus à des facteurs génétiques et à leur état de santé (Lagace *et al.* 2006). Récemment, Alborn *et al.* ont clairement démontré que le niveau de PCSK9 dans le plasma était positivement corrélé au niveau de cholestérol LDL chez des individus sains (Alborn *et al.* 2007). Ils ont proposé que le PCSK9 sécrété compte pour 20 % de la

variabilité du niveau de LDL-c dans le sang (Alborn *et al.* 2007; Lambert *et al.* 2008). De plus en plus, la progression de l'infection du VHC semble être liée au profil lipidique de l'individu. En ce sens, il est possible que les personnes VHC positives ayant une plus grande concentration de PCSK9 en circulation soient plus capable d'éliminer le virus. En effet, une étude récente faite chez une grande cohorte d'individus suggère que la virémie du VHC est associée à un faible taux de cholestérol et de triglycérides (Dai *et al.* 2008). Ces résultats sont en accord avec notre hypothèse suggérant qu'un faible niveau de PCSK9 en circulation mène à une faible dégradation du LDLR et de CD81 donc à un faible taux de LDL-c et par le fait même à une forte virémie. Dans le même sens, un fort taux de cholestérol dans le plasma des patients infectés est corrélé à une meilleure réponse au traitement interféron (Loguercio *et al.* 2008). Nos résultats permettent de postuler que ces patients bénéficient probablement d'une concentration élevée de PCSK9 en circulation dans le sang.

En conclusion, nos résultats nous permettent de croire que PCSK9 a un effet antiviral exploitable au niveau pharmaceutique qui doit être confirmé chez l'humain. Entre temps, plusieurs études doivent être effectuées pour comprendre davantage le rôle de PCSK9 dans la régulation du LDLR et surtout du CD81 ainsi que son rôle dans l'infection du VHC et d'autres virus. La recherche sur le développement d'une thérapie pour traiter plus efficacement la dyslipidémie est primordiale connaissant le taux de mortalité relié aux maladies qui y sont associées. Des rapports indépendants chez deux patients en santé portants des mutations de type *perte de fonction* complètement dépourvue de PCSK9 indiquent clairement qu'une intervention pharmacologique qui inhiberait PCSK9 serait sécuritaire. En combinaison avec les statines, l'effet de PCSK9 sur le niveau de LDL-c serait davantage bénéfique pour traiter une dyslipidémie. De l'autre côté, une grande concentration de PCSK9 empêche le VHC de pénétrer la cellule, car il enlève de la surface CD81. Encore une fois, un agent spécifique imitant l'interaction de PCSK9 avec le CD81 est une idée prometteuse. À plus petite échelle, la mesure de la quantité de PCSK9 pourrait être un outil clinique très avantageux. Par exemple, l'évaluation par test ELISA de la concentration de PCSK9 en circulation chez les patients répondant bien au traitement interféron serait utile pour faire une corrélation avec le degré de réponse aux

drogues antivirales. Enfin, un scénario probable dans le traitement du VHC dans le futur est une combinaison de drogues avec des mécanismes d'action distincts afin de cibler toutes les formes de particules virales existantes.

Bibliographie

Liste des références

- Abifadel M., Varret M., Rabes J.P., Allard D., Ouguerram K., Devillers M., Cruaud C., Benjannet S., Wickham L., Erlich D., Derre A., Villeger L., Farnier M., Beucler I., Bruckert E., Chambaz J., Chanu B., Lecerf J.M., Luc G., Moulin P., Weissenbach J., Prat A., Krempf M., Junien C., Seidah N.G. et Boileau C. (2003). "Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia." Nat Genet. 34, 154-6.
- Agnello V., Abel G., Elfahal M., Knight G.B. et Zhang Q.X. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 12766-71.
- Agnello V., Chung R.T. et Kaplan L.M. (1992). "A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia." N Engl J Med. 327, 1490-5.
- Alborn W.E., Cao G., Careskey H.E., Qian Y.W., Subramaniam D.R., Davies J., Conner E.M. et Konrad R.J. (2007). "Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol." Clin Chem. 53, 1814-9.
- Andre P., Komurian-Pradel F., Deforges S., Perret M., Berland J.L., Sodoyer M., Pol S., Brechot C., Paranhos-Baccala G. et Lotteau V. (2002). "Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles." J Virol. 76, 6919-28.
- Andre P. et Lotteau V. (2008). "Hepatitis C virus assembly: when fat makes it easier." J Hepatol. 49, 153-5.
- Andreo U., Maillard P., Kalinina O., Walic M., Meurs E., Martinot M., Marcellin P. et Budkowska A. (2007). "Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection." Cell Microbiol. 9, 2445-56.
- Arumugaswami V., Remenyi R., Kanagavel V., Sue E.Y., Ngoc Ho T., Liu C., Fontanes V., Dasgupta A. et Sun R. (2008). "High-resolution functional profiling of hepatitis C virus genome." PLoS Pathog. 4, e1000182.
- Bartenschlager R., Frese M. et Pietschmann T. (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence." Adv Virus Res. 63, 71-180.
- Bartenschlager R. et Lohmann V. (2000). "Replication of hepatitis C virus." J Gen Virol. 81, 1631-48.
- Barth H., Schafer C., Adah M.I., Zhang F., Linhardt R.J., Toyoda H., Kinoshita-Toyoda A., Toida T., Van Kuppevelt T.H., Depla E., Von Weizsacker F., Blum H.E. et Baumert T.F. (2003). "Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate." J Biol Chem. 278, 41003-12.
- Bartosch B., Dubuisson J. et Cosset F.L. (2003). "Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes." J Exp Med. 197, 633-42.
- Bartosch B., Verney G., Dreux M., Donot P., Morice Y., Penin F., Pawlotsky J.M., Lavillette D. et Cosset F.L. (2005). "An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-

- density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies." *J Virol.* 79, 8217-29.
- Bartosch B., Vitelli A., Granier C., Goujon C., Dubuisson J., Pascale S., Scarselli E., Cortese R., Nicosia A. et Cosset F.L. (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, 41624-30.
- Basak A., Zhong M., Munzer J.S., Chretien M. et Seidah N.G. (2001). "Implication of the proprotein convertases furin, PC5 and PC7 in the cleavage of surface glycoproteins of Hong Kong, Ebola and respiratory syncytial viruses: a comparative analysis with fluorogenic peptides." *Biochem J.* 353, 537-45.
- Bassi D.E., Fu J., Lopez de Cicco R. et Klein-Szanto A.J. (2005). "Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression." *Mol Carcinog.* 44, 151-61.
- Basu A., Kanda T., Beyene A., Saito K., Meyer K. et Ray R. (2007). "Sulfated homologues of heparin inhibit hepatitis C virus entry into mammalian cells." *J Virol.* 81, 3933-41.
- Benjannet S., Rhainds D., Essalmani R., Mayne J., Wickham L., Jin W., Asselin M.C., Hamelin J., Varret M., Allard D., Trillard M., Abifadel M., Tebon A., Attie A.D., Rader D.J., Boileau C., Brissette L., Chretien M., Prat A. et Seidah N.G. (2004). "NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol." *J Biol Chem.* 279, 48865-75.
- Bertaux C. et Dragic T. (2006). "Different domains of CD81 mediate distinct stages of hepatitis C virus pseudoparticle entry." *J Virol.* 80, 4940-8.
- Blight K.J., Kolykhalov A.A. et Rice C.M. (2000). "Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture." *Science.* 290, 1972-4.
- Blight K.J., McKeating J.A., Marcotrigiano J. et Rice C.M. (2003). "Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture." *J Virol.* 77, 3181-90.
- Blight K.J., McKeating J.A. et Rice C.M. (2002). "Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication." *J Virol.* 76, 13001-14.
- Bradley D., McCaustland K., Krawczynski K., Spelbring J., Humphrey C. et Cook E.H. (1991). "Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose." *J Med Virol.* 34, 206-8.
- Callens N., Ciczora Y., Bartosch B., Vu-Dac N., Cosset F.L., Pawlotsky J.M., Penin F. et Dubuisson J. (2005). "Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry." *J Virol.* 79, 15331-41.
- Calvo D. et Vega M.A. (1993). "Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family." *J Biol Chem.* 268, 18929-35.
- Chang K.S., Jiang J., Cai Z. et Luo G. (2007). "Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture." *J Virol.* 81, 13783-93.
- Charrin S., Le Naour F., Labas V., Billard M., Le Caer J.P., Emile J.F., Petit M.A., Boucheix C. et Rubinstein E. (2003). "EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells." *Biochem J.* 373, 409-21.

- Cocquerel L., Voisset C. et Dubuisson J. (2006). "Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions." *J Gen Virol.* 87, 1075-84.
- Codran A., Royer C., Jaeck D., Bastien-Valle M., Baumert T.F., Kiény M.P., Pereira C.A. et Martin J.P. (2006). "Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis." *J Gen Virol.* 87, 2583-93.
- Cohen J., Pertsemlidis A., Kotowski I.K., Graham R., Garcia C.K. et Hobbs H.H. (2005). "Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9." *Nat Genet.* 37, 161-5.
- Dai C.Y., Chuang W.L., Ho C.K., Hsieh M.Y., Huang J.F., Lee L.P., Hou N.J., Lin Z.Y., Chen S.C., Wang L.Y., Tsai J.F., Chang W.Y. et Yu M.L. (2008). "Associations between hepatitis C viremia and low serum triglyceride and cholesterol levels: a community-based study." *J Hepatol.* 49, 9-16.
- Date T., Kato T., Miyamoto M., Zhao Z., Yasui K., Mizokami M. et Wakita T. (2004). "Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells." *J Biol Chem.* 279, 22371-6.
- Davis G.L., Krawczynski K. et Szabo G. (2007). "Hepatitis C virus infection--pathobiology and implications for new therapeutic options." *Dig Dis Sci.* 52, 857-75.
- Day C.P. et James O.F. (1998). "Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party?" *Hepatology.* 27, 1463-6.
- Denault J.B. et Leduc R. (1996). "Furin/PACE/SPC1: a convertase involved in exocytic and endocytic processing of precursor proteins." *FEBS Lett.* 379, 113-6.
- Deneka M., Pelchen-Matthews A., Byland R., Ruiz-Mateos E. et Marsh M. (2007). "In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53." *J Cell Biol.* 177, 329-41.
- Dharancy S., Malapel M., Perlemuter G., Roskams T., Cheng Y., Dubuquoy L., Podevin P., Conti F., Canva V., Philippe D., Gambiez L., Mathurin P., Paris J.C., Schoonjans K., Calmus Y., Pol S., Auwerx J. et Desreumaux P. (2005). "Impaired expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha during hepatitis C virus infection." *Gastroenterology.* 128, 334-42.
- Diedrich G. (2006). "How does hepatitis C virus enter cells?" *FEBS J.* 273, 3871-85.
- Drummer H.E., Wilson K.A. et Pountourios P. (2002). "Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81." *J Virol.* 76, 11143-7.
- Drummer H.E., Wilson K.A. et Pountourios P. (2005). "Determinants of CD81 dimerization and interaction with hepatitis C virus glycoprotein E2." *Biochem Biophys Res Commun.* 328, 251-7.
- Dubois C.M., Blanchette F., Laprise M.H., Leduc R., Grondin F. et Seidah N.G. (2001). "Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme." *Am J Pathol.* 158, 305-16.
- Dubuisson J. (2007). "Hepatitis C virus proteins." *World J Gastroenterol.* 13, 2406-15.
- El-Hage N. et Luo G. (2003). "Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA." *J Gen Virol.* 84, 2761-9.
- Essalmani R., Zaid A., Marcinkiewicz J., Chamberland A., Pasquato A., Seidah N.G. et Prat A. (2008). "In vivo functions of the proprotein convertase PC5/6 during

- mouse development: Gdf11 is a likely substrate." Proc Natl Acad Sci U S A. 105, 5750-5.
- Evans M.J., von Hahn T., Tscherne D.M., Syder A.J., Panis M., Wolk B., Hatzioannou T., McKeating J.A., Bieniasz P.D. et Rice C.M. (2007). "Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry." Nature. 446, 801-5.
- Flint M., Maidens C., Loomis-Price L.D., Shotton C., Dubuisson J., Monk P., Higginbottom A., Levy S. et McKeating J.A. (1999). "Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81." J Virol. 73, 6235-44.
- Friebe P., Lohmann V., Krieger N. et Bartenschlager R. (2001). "Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication." J Virol. 75, 12047-57.
- Gagnon J., Mayne J., Mbikay M., Woulfe J. et Chretien M. (2008). "Expression of PCSK1 (PC1/3), PCSK2 (PC2) and PCSK3 (furin) in mouse small intestine." Regul Pept. 152, 54-60.
- Gardner J.P., Durso R.J., Arrigale R.R., Donovan G.P., Maddon P.J., Dragic T. et Olson W.C. (2003). "L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 4498-503.
- Gastaminza P., Kapadia S.B. et Chisari F.V. (2006). "Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles." J Virol. 80, 11074-81.
- Germi R., Crance J.M., Garin D., Guimet J., Lortat-Jacob H., Ruigrok R.W., Zarski J.P. et Drouet E. (2002). "Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption." J Med Virol. 68, 206-15.
- Gosert R., Egger D., Lohmann V., Bartenschlager R., Blum H.E., Bienz K. et Moradpour D. (2003). "Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons." J Virol. 77, 5487-92.
- Grove J., Huby T., Stamataki Z., Vanwolleghem T., Meuleman P., Farquhar M., Schwarz A., Moreau M., Owen J.S., Leroux-Roels G., Balfe P. et McKeating J.A. (2007). "Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity." J Virol. 81, 3162-9.
- Helle F. et Dubuisson J. (2008). "Hepatitis C virus entry into host cells." Cell Mol Life Sci. 65, 100-12.
- Higginbottom A., Quinn E.R., Kuo C.C., Flint M., Wilson L.H., Bianchi E., Nicosia A., Monk P.N., McKeating J.A. et Levy S. (2000). "Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2." J Virol. 74, 3642-9.
- Hijkata M., Shimizu Y.K., Kato H., Iwamoto A., Shih J.W., Alter H.J., Purcell R.H. et Yoshikura H. (1993). "Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes." J Virol. 67, 1953-8.
- Hofmann W.P., Sarrazin C., Kronenberger B., Schonberger B., Bruch K. et Zeuzem S. (2003). "Mutations within the CD81-binding sites and hypervariable region 2 of the envelope 2 protein: correlation with treatment response in hepatitis C virus-infected patients." J Infect Dis. 187, 982-7.

- Holla O.L., Cameron J., Berge K.E., Ranheim T. et Leren T.P. (2007). "Degradation of the LDL receptors by PCSK9 is not mediated by a secreted protein acted upon by PCSK9 extracellularly." BMC Cell Biol. 8, 9.
- Hooper A.J., Marais A.D., Tanyanyiwa D.M. et Burnett J.R. (2007). "The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population." Atherosclerosis. 193, 445-8.
- Hsu M., Zhang J., Flint M., Logvinoff C., Cheng-Mayer C., Rice C.M. et McKeating J.A. (2003). "Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles." Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 7271-6.
- Huang H., Sun F., Owen D.M., Li W., Chen Y., Gale M., Jr. et Ye J. (2007). "Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins." Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 5848-53.
- Ikeda M., Yi M., Li K. et Lemon S.M. (2002). "Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells." J Virol. 76, 2997-3006.
- Indolfi G., Bartolini E., Azzari C., Becciolini L., Moriondo M., de Martino M. et Resti M. (2008). "Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: infection of the father predicts the risk of perinatal transmission." J Med Virol. 80, 1907-11.
- Jin W., Fuki I.V., Seidah N.G., Benjannet S., Glick J.M. et Rader D.J. (2005). "Proprotein convertases [corrected] are responsible for proteolysis and inactivation of endothelial lipase." J Biol Chem. 280, 36551-9.
- Kanto T., Hayashi N., Takehara T., Hagiwara H., Mita E., Naito M., Kasahara A., Fusamoto H. et Kamada T. (1995). "Density analysis of hepatitis C virus particle population in the circulation of infected hosts: implications for virus neutralization or persistence." J Hepatol. 22, 440-8.
- Kapadia S.B., Barth H., Baumert T., McKeating J.A. et Chisari F.V. (2007). "Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I." J Virol. 81, 374-83.
- Kato T., Date T., Miyamoto M., Furusaka A., Tokushige K., Mizokami M. et Wakita T. (2003). "Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon." Gastroenterology. 125, 1808-17.
- Kato T., Furusaka A., Miyamoto M., Date T., Yasui K., Hiramoto J., Nagayama K., Tanaka T. et Wakita T. (2001). "Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient." J Med Virol. 64, 334-9.
- Kolykhalov A.A., Agapov E.V., Blight K.J., Mihalik K., Feinstone S.M. et Rice C.M. (1997). "Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA." Science. 277, 570-4.
- Kolykhalov A.A., Feinstone S.M. et Rice C.M. (1996). "Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA." J Virol. 70, 3363-71.
- Kolykhalov A.A., Mihalik K., Feinstone S.M. et Rice C.M. (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, 2046-51.

- Kono Y., Hayashida K., Tanaka H., Ishibashi H. et Harada M. (2003). "High-density lipoprotein binding rate differs greatly between genotypes 1b and 2a/2b of hepatitis C virus." J Med Virol. 70, 42-8.
- Kotowski I.K., Pertsemlidis A., Luke A., Cooper R.S., Vega G.L., Cohen J.C. et Hobbs H.H. (2006). "A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol." Am J Hum Genet. 78, 410-22.
- Koutsoudakis G., Kaul A., Steinmann E., Kallis S., Lohmann V., Pietschmann T. et Bartenschlager R. (2006). "Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses." J Virol. 80, 5308-20.
- Kwon H.J., Lagace T.A., McNutt M.C., Horton J.D. et Deisenhofer J. (2008). "Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9." Proc Natl Acad Sci U S A. 105, 1820-5.
- Lagace T.A., Curtis D.E., Garuti R., McNutt M.C., Park S.W., Prather H.B., Anderson N.N., Ho Y.K., Hammer R.E. et Horton J.D. (2006). "Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice." J Clin Invest. 116, 2995-3005.
- Lambert G., Ancellin N., Charlton F., Comas D., Pilot J., Keech A., Patel S., Sullivan D.R., Cohn J.S., Rye K.A. et Barter P.J. (2008). "Plasma PCSK9 concentrations correlate with LDL and total cholesterol in diabetic patients and are decreased by fenofibrate treatment." Clin Chem. 54, 1038-45.
- Lambert G., Charlton F., Rye K.A. et Piper D.E. (2008). "Molecular basis of PCSK9 function." Atherosclerosis. 203, 1-7.
- Lambot M., Fretier S., Op De Beeck A., Quatannens B., Lestavel S., Clavey V. et Dubuisson J. (2002). "Reconstitution of hepatitis C virus envelope glycoproteins into liposomes as a surrogate model to study virus attachment." J Biol Chem. 277, 20625-30.
- Lavie M., Goffard A. et Dubuisson J. (2007). "Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer." Curr Issues Mol Biol. 9, 71-86.
- Lavillette D., Morice Y., Germanidis G., Donot P., Soulier A., Pagkalos E., Sakellariou G., Intrator L., Bartosch B., Pawlotsky J.M. et Cosset F.L. (2005). "Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection." J Virol. 79, 6023-34.
- Levy S., Todd S.C. et Maecker H.T. (1998). "CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system." Annu Rev Immunol. 16, 89-109.
- Li J., Tumanut C., Gavigan J.A., Huang W.J., Hampton E.N., Tumanut R., Suen K.F., Trauger J.W., Spraggon G., Lesley S.A., Liao G., Yowe D. et Harris J.L. (2007). "Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity." Biochem J. 406, 203-7.
- Lindenbach B.D., Evans M.J., Syder A.J., Wolk B., Tellinghuisen T.L., Liu C.C., Maruyama T., Hynes R.O., Burton D.R., McKeating J.A. et Rice C.M. (2005). "Complete replication of hepatitis C virus in cell culture." Science. 309, 623-6.
- Lindenbach B.D., Meuleman P., Ploss A., Vanwolleghem T., Syder A.J., McKeating J.A., Lanford R.E., Feinstone S.M., Major M.E., Leroux-Roels G. et Rice C.M.

- (2006). "Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A. 103, 3805-9.
- Loguercio C., Federico A., Masarone M., Torella R., Blanco C.D. et Persico M. (2008). "The Impact of Diet on Liver Fibrosis and on Response to Interferon Therapy in Patients With HCV-Related Chronic Hepatitis." Am J Gastroenterol.
- Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L. et Bartenschlager R. (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." Science. 285, 110-3.
- Lopez D. (2008). "PCSK9: an enigmatic protease." Biochim Biophys Acta. 1781, 184-91.
- Lunel F. et Musset L. (1998). "Hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia." J Hepatol. 29, 848-55.
- Maillard P., Huby T., Andreo U., Moreau M., Chapman J. et Budkowska A. (2006). "The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Clal is mediated by ApoB-containing lipoproteins." FASEB J. 20, 735-7.
- Martin C., Nielsen S.U., Ibrahim S., Bassendine M.F. et Toms G.L. (2008). "Binding of liver derived, low density hepatitis C virus to human hepatoma cells." J Med Virol. 80, 816-23.
- Masciopinto F., Giovani C., Campagnoli S., Galli-Stampino L., Colombatto P., Brunetto M., Yen T.S., Houghton M., Pileri P. et Abrignani S. (2004). "Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes." Eur J Immunol. 34, 2834-42.
- Mayne J., Raymond A., Chaplin A., Cousins M., Kaefer N., Gyamera-Acheampong C., Seidah N.G., Mbikay M., Chretien M. et Ooi T.C. (2007). "Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women." Biochem Biophys Res Commun. 361, 451-6.
- McCaffrey K., Boo I., Poubourios P. et Drummer H.E. (2007). "Expression and characterization of a minimal hepatitis C virus glycoprotein E2 core domain that retains CD81 binding." J Virol. 81, 9584-90.
- McGovern B.H., Abu Dayyeh B.K. et Chung R.T. (2008). "Avoiding therapeutic pitfalls: the rational use of specifically targeted agents against hepatitis C infection." Hepatology. 48, 1700-12.
- McKeating J.A., Zhang L.Q., Logvinoff C., Flint M., Zhang J., Yu J., Butera D., Ho D.D., Dustin L.B., Rice C.M. et Balfe P. (2004). "Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner." J Virol. 78, 8496-505.
- Meertens L., Bertaux C., Cukierman L., Cormier E., Lavillette D., Cosset F.L. et Dragic T. (2008). "The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus." J Virol. 82, 3555-60.
- Meertens L., Bertaux C. et Dragic T. (2006). "Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles." J Virol. 80, 11571-8.
- Misiani R., Bellavita P., Fenili D., Borelli G., Marchesi D., Massazza M., Vendramin G., Comotti B., Tanzi E., Scudeller G. et et al. (1992). "Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia." Ann Intern Med. 117, 573-7.
- Miyazawa Y., Atsuzawa K., Usuda N., Watashi K., Hishiki T., Zayas M., Bartenschlager R., Wakita T., Hijikata M. et Shimotohno K. (2007). "The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production." Nat Cell Biol. 9, 1089-97.

- 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 J.M., Sa-Cunha A. et Maurel P. (2007). "The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus." *J Hepatol.* 46, 411-9.
- Monazahian M., Bohme I., Bonk S., Koch A., Scholz C., Grethe S. et Thomssen R. (1999). "Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus." *J Med Virol.* 57, 223-9.
- Monazahian M., Kippenberger S., Muller A., Seitz H., Bohme I., Grethe S. et Thomssen R. (2000). "Binding of human lipoproteins (low, very low, high density lipoproteins) to recombinant envelope proteins of hepatitis C virus." *Med Microbiol Immunol.* 188, 177-84.
- Morikawa K., Zhao Z., Date T., Miyamoto M., Murayama A., Akazawa D., Tanabe J., Sone S. et Wakita T. (2007). "The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles." *J Med Virol.* 79, 714-23.
- Nassoury N., Blasiolo D.A., Tebon Oler A., Benjannet S., Hamelin J., Poupon V., McPherson P.S., Attie A.D., Prat A. et Seidah N.G. (2007). "The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR." *Traffic.* 8, 718-32.
- Nielsen S.U., Bassendine M.F., Burt A.D., Martin C., Pumeechockchai W. et Toms G.L. (2006). "Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients." *J Virol.* 80, 2418-28.
- Nielsen S.U., Bassendine M.F., Martin C., Lowther D., Purcell P.J., King B.J., Neely D. et Toms G.L. (2008). "Characterization of hepatitis C RNA-containing particles from human liver by density and size." *J Gen Virol.* 89, 2507-17.
- Nour N., Mayer G., Mort J.S., Salvas A., Mbikay M., Morrison C.J., Overall C.M. et Seidah N.G. (2005). "The cysteine-rich domain of the secreted proprotein convertases PC5A and PACE4 functions as a cell surface anchor and interacts with tissue inhibitors of metalloproteinases." *Mol Biol Cell.* 16, 5215-26.
- Parfieniuk A., Jaroszewicz J. et Flisiak R. (2007). "Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus." *World J Gastroenterol.* 13, 5673-81.
- Park S.W., Moon Y.A. et Horton J.D. (2004). "Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver." *J Biol Chem.* 279, 50630-8.
- Perez-Berna A.J., Guillen J., Moreno M.R., Bernabeu A., Pabst G., Laggner P. et Villalain J. (2008). "Identification of the membrane-active regions of hepatitis C virus p7 protein: biophysical characterization of the loop region." *J Biol Chem.* 283, 8089-101.
- Perlemuter G., Sabile A., Letteron P., Vona G., Topilco A., Chretien Y., Koike K., Pessayre D., Chapman J., Barba G. et Brechot C. (2002). "Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis." *FASEB J.* 16, 185-94.
- Petit J.M., Minello A., Duvillard L., Jooste V., Monier S., Texier V., Bour J.B., Poussier A., Gambert P., Verges B. et Hillon P. (2007). "Cell surface expression of LDL

- receptor in chronic hepatitis C: correlation with viral load." Am J Physiol Endocrinol Metab. 293, E416-20.
- Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., Galli G., Falugi F., Petracca R., Weiner A.J., Houghton M., Rosa D., Grandi G. et Abrignani S. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." Science. 282, 938-41.
- Pohlmann S., Zhang J., Baribaud F., Chen Z., Leslie G.J., Lin G., Granelli-Piperno A., Doms R.W., Rice C.M. et McKeating J.A. (2003). "Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR." J Virol. 77, 4070-80.
- Poirier S., Mayer G., Benjannet S., Bergeron E., Marcinkiewicz J., Nassoury N., Mayer H., Nimpf J., Prat A. et Seidah N.G. (2008). "The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2." J Biol Chem. 283, 2363-72.
- Qian Y.W., Schmidt R.J., Zhang Y., Chu S., Lin A., Wang H., Wang X., Beyer T.P., Bensch W.R., Li W., Ehsani M.E., Lu D., Konrad R.J., Eacho P.I., Moller D.E., Karathanasis S.K. et Cao G. (2007). "Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis." J Lipid Res. 48, 1488-98.
- Rhoads D. et Brissette L. (2004). "The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders." Int J Biochem Cell Biol. 36, 39-77.
- 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. et Cocquerel L. (2008). "The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry." PLoS ONE. 3, e1866.
- Roebroek A.J., Umans L., Pauli I.G., Robertson E.J., van Leuven F., Van de Ven W.J. et Constam D.B. (1998). "Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin." Development. 125, 4863-76.
- Sakai A., Claire M.S., Faulk K., Govindarajan S., Emerson S.U., Purcell R.H. et Bukh J. (2003). "The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences." Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 11646-51.
- Sakai J., Rawson R.B., Espenshade P.J., Cheng D., Seegmiller A.C., Goldstein J.L. et Brown M.S. (1998). "Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells." Mol Cell. 2, 505-14.
- Sansonno D., Iacobelli A.R., Cornacchiulo V., Lauletta G., Distasi M.A., Gatti P. et Dammacco F. (1996). "Immunochemical and biomolecular studies of circulating immune complexes isolated from patients with acute and chronic hepatitis C virus infection." Eur J Clin Invest. 26, 465-75.
- Saunier B., Triyatni M., Ulianich L., Maruvada P., Yen P. et Kohn L.D. (2003). "Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes." J Virol. 77, 546-59.
- Scamuffa N., Calvo F., Chretien M., Seidah N.G. et Khatib A.M. (2006). "Proprotein convertases: lessons from knockouts." FASEB J. 20, 1954-63.
- Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R.M., Acali S., Filocamo G., Traboni C., Nicosia A., Cortese R. et Vitelli A. (2002). "The human scavenger receptor class

- B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus." EMBO J. 21, 5017-25.
- Schmidt R.J., Zhang Y., Zhao Y., Qian Y.W., Wang H., Lin A., Ehsani M.E., Yu X., Wang G., Singh J., Su E.W., Li S., Konrad R.J. et Cao G. (2008). "A novel splicing variant of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9." DNA Cell Biol. 27, 183-9.
- Seidah N.G., Benjannet S., Wickham L., Marcinkiewicz J., Jasmin S.B., Stifani S., Basak A., Prat A. et Chretien M. (2003). "The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 928-33.
- Seidah N.G., Mayer G., Zaid A., Rousselet E., Nassoury N., Poirier S., Essalmani R. et Prat A. (2008). "The activation and physiological functions of the proprotein convertases." Int J Biochem Cell Biol. 40, 1111-25.
- Seidah N.G. et Prat A. (2007). "The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia." J Mol Med. 85, 685-96.
- Shiryaev S.A., Remacle A.G., Ratnikov B.I., Nelson N.A., Savinov A.Y., Wei G., Bottini M., Rega M.F., Parent A., Desjardins R., Fugere M., Day R., Sabet M., Pellicchia M., Liddington R.C., Smith J.W., Mustelin T., Guiney D.G., Lebl M. et Strongin A.Y. (2007). "Targeting host cell furin proprotein convertases as a therapeutic strategy against bacterial toxins and viral pathogens." J Biol Chem. 282, 20847-53.
- Simmonds P., Holmes E.C., Cha T.A., Chan S.W., McOmish F., Irvine B., Beall E., Yap P.L., Kolberg J. et Urdea M.S. (1993). "Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region." J Gen Virol. 74 (Pt 11), 2391-9.
- Steinmann E., Penin F., Kallis S., Patel A.H., Bartenschlager R. et Pietschmann T. (2007). "Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions." PLoS Pathog. 3, e103.
- Stipp C.S., Orlicky D. et Hemler M.E. (2001). "FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9-associated protein." J Biol Chem. 276, 4853-62.
- Suzuki T., Aizaki H., Murakami K., Shoji I. et Wakita T. (2007). "Molecular biology of hepatitis C virus." J Gastroenterol. 42, 411-23.
- Tellinghuisen T.L., Evans M.J., von Hahn T., You S. et Rice C.M. (2007). "Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus." J Virol. 81, 8853-67.
- Thomson B.J. et Finch R.G. (2005). "Hepatitis C virus infection." Clin Microbiol Infect. 11, 86-94.
- Thomssen R., Bonk S., Propfe C., Heermann K.H., Kochel H.G. et Uy A. (1992). "Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein." Med Microbiol Immunol. 181, 293-300.
- Thomssen R., Bonk S. et 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, 329-34.
- Troesch M., Meunier I., Lapierre P., Lapointe N., Alvarez F., Boucher M. et Soudeyns H. (2006). "Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein." Virology. 352, 357-67.

- Tscherne D.M., Jones C.T., Evans M.J., Lindenbach B.D., McKeating J.A. et Rice C.M. (2006). "Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry." *J Virol.* 80, 1734-41.
- Van Itallie C.M. et Anderson J.M. (2006). "Claudins and epithelial paracellular transport." *Annu Rev Physiol.* 68, 403-29.
- Vincent M.J., Sanchez A.J., Erickson B.R., Basak A., Chretien M., Seidah N.G. et Nichol S.T. (2003). "Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1." *J Virol.* 77, 8640-9.
- Voisset C., Callens N., Blanchard E., Op De Beeck A., Dubuisson J. et Vu-Dac N. (2005). "High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I." *J Biol Chem.* 280, 7793-9.
- von Hahn T., Lindenbach B.D., Boullier A., Quehenberger O., Paulson M., Rice C.M. et McKeating J.A. (2006). "Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells." *Hepatology.* 43, 932-42.
- Wakita T., Pietschmann T., Kato T., Date T., Miyamoto M., Zhao Z., Murthy K., Habermann A., Krausslich H.G., Mizokami M., Bartenschlager R. et Liang T.J. (2005). "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." *Nat Med.* 11, 791-6.
- Wunschmann S., Medh J.D., Klinzmann D., Schmidt W.N. et Stapleton J.T. (2000). "Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor." *J Virol.* 74, 10055-62.
- Yanagi M., Purcell R.H., Emerson S.U. et Bukh J. (1997). "Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 8738-43.
- Yang W., Qiu C., Biswas N., Jin J., Watkins S.C., Montelaro R.C., Coyne C.B. et Wang T. (2008). "Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus." *J Biol Chem.* 283, 8643-53.
- Ye J. (2007). "Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus." *PLoS Pathog.* 3, e108.
- Zahn A. et Allain J.P. (2005). "Hepatitis C virus and hepatitis B virus bind to heparin: purification of largely IgG-free virions from infected plasma by heparin chromatography." *J Gen Virol.* 86, 677-85.
- Zeisel M.B., Koutsoudakis G., Schnober E.K., Haberstroh A., Blum H.E., Cosset F.L., Wakita T., Jaeck D., Doffoel M., Royer C., Soulier E., Schvoerer E., Schuster C., Stoll-Keller F., Bartenschlager R., Pietschmann T., Barth H. et Baumert T.F. (2007). "Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81." *Hepatology.* 46, 1722-31.
- Zhang D.W., Lagace T.A., Garuti R., Zhao Z., McDonald M., Horton J.D., Cohen J.C. et Hobbs H.H. (2007). "Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation." *J Biol Chem.* 282, 18602-12.
- Zhang J., Randall G., Higginbottom A., Monk P., Rice C.M. et McKeating J.A. (2004). "CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection." *J Virol.* 78, 1448-55.

- Zhao Z., Tuakli-Wosornu Y., Lagace T.A., Kinch L., Grishin N.V., Horton J.D., Cohen J.C. et Hobbs H.H. (2006). "Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote." Am J Hum Genet. 79, 514-23.
- Zhong J., Gastaminza P., Chung J., Stamataki Z., Isogawa M., Cheng G., McKeating J.A. et Chisari F.V. (2006). "Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host." J Virol. 80, 11082-93.