

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE MURIN PERMETTANT LA
RÉPLICATION DU VIRUS DE L'HÉPATITE C IN VIVO ET ÉTUDE
SUR L'AUTOPHAGIE**

Par
Carl Guévin

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne :

Pierre Talbot
INRS-Institut Armand-Frappier
INRS

Examinateur externe :

Carl A Gagnon
Département de pathologie et
microbiologie
Faculté de Médecine Vétérinaire
Université de Montréal

Examinateur externe :

Hugo Soudeyns
Département de microbiologie et
immunologie
Université de Montréal

Directeur de recherche :

Patrick Labonté
INRS-Institut Armand-Frappier
INRS

Résumé

On estime que 2% de la population mondiale est infectée par le virus de l'hépatite C (VHC). Ce virus, transmis par la voie parentérale, déjoue le système immunitaire et s'installe de façon chronique chez plus de 80% des individus infectés. La réPLICATION constante et soutenue du virus dans les cellules hépatiques favorise le développement de cirrhoses au foie et ultimement l'apparition de carcinomes hépatocellulaires (CHC). Malheureusement, il n'existe aucun vaccin ou médicament efficace pour traiter les gens atteints du VHC. Jusqu'à aujourd'hui, le développement de stratégies thérapeutiques efficaces a été fortement limité par les difficultés liées à l'établissement de modèles de réPLICATION *in vivo*. L'objectif principal du projet de recherche est la mise au point d'un modèle murin simple, accessible et peu coûteux permettant la réPLICATION du VHC ainsi que la production de particules virales *in vivo*. Le modèle animal est basé sur la génération de tumeur humaine dans des souris immunodéficientes SCID/beige, à l'aide d'une lignée hépatocarcinome humain tumorigénique Huh7.7 infectée par le clone moléculaire JFH1 du VHC. Préalablement infectées par le VHC, ces tumeurs ont la capacité de sécréter des particules virales infectieuses dans le sang de l'animal. Suivant l'infection, les souris développent une virémie allant jusqu'à 10^5 GE/ml (génome équivalent par millilitre) dans le sérum et de 10^7 GE/ μ g d'ARN VHC dans les tumeurs. Des analyses en immunohistochimie ont démontré que le VHC se répliquait activement à l'intérieur des tumeurs infectées par le virus. De plus, le virus provenant des souris infectées s'est révélé infectieux en culture cellulaire. Finalement, nous avons démontré que l'interféron- α et l'inhibiteur de protéase BILN-2061 pouvaient inhiber la réPLICATION *in vivo* du VHC de souche JFH-1 produit en culture cellulaire (VHCcc). En conclusion, nous avons développé un modèle murin du VHC simple et peu dispendieux permettant de produire des particules virales infectieuses *in vivo*. Ce modèle animal sera d'une grande utilité dans la caractérisation et le développement de nouveaux agents antiviraux contre le VHC.

Le deuxième article présenté dans cette thèse traite de l'interaction de la protéine autophagique ATG5 avec l'ARN polymérase ARN-dépendante (NS5B) du virus de

l'hépatite C au début de l'infection virale. L'autophagie est un processus cellulaire catabolique important par lequel la protéine ATG5 déclenche la formation de vésicules à double membrane (DMV). Il a été montré, lors de l'infection virale, que les DMV peuvent héberger le complexe de réPLICATION de certains virus à ARN de polarité positive tels que le virus de l'hépatite murine (MHV), le poliovirus et le virus de l'artérite équine. Récemment, il a été montré que les protéines autophagiques agissent comme facteurs proviraux favorisant l'initiation de l'infection du VHC. Dans cet article, nous avons identifié une interaction entre la protéine autophagique ATG5 et la protéine NS5B du VHC. L'interaction physico-chimique ATG5/NS5B a été confirmée par des analyses de co-immunoprecipitation et marquage métabolique. De plus, nous avons observé une co-localisation entre ATG5 et NS4B, une protéine virale impliquée dans la formation d'un réseau membranaire désigné « *membranous web* ». À deux jours post-infection, nous avons observé, par analyses en immunofluorescence, une forte co-localisation entre ATG5 et NS5B dans les régions périnucléaires des cellules infectées. Toutefois, cette co-localisation s'est avérée négative cinq jours post-infection, suggérant que le VHC utilise ATG5 comme un facteur proviral spécifiquement lors de l'initiation de l'infection. Finalement, l'inhibition de l'expression d'ATG5, à l'aide de siRNA spécifiques, permet de bloquer la réPLICATION du VHC. En conclusion, les résultats de cette thèse de doctorat apporteront des informations pertinentes au niveau de l'avancement des modèles animaux du VHC et une meilleure compréhension du rôle de l'autophagie dans l'infection du VHC.

Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, Dr Patrick Labonté, pour son encadrement, sa rigueur scientifique de même que sa patience tout au long de mon projet de doctorat. Merci au Dr Alain Lamarre pour ses critiques constructives et ses judicieux conseils.

J'aimerais aussi remercier tous mes collègues de laboratoire et amis pour leur support quotidien : Véronique Bougie, Synthia Begley, Claudia Bélanger, Quoc Tuan Le, Christian Dugay, Matthieu Blanchet et Ahmed Fahmy. Pour leur support technique, merci à Robert Alain, Marcel Desrosiers, Micheline Letarte, Louise Wilson, Hakim Slimani.

Un grand merci à mes amis Maria, Alain, Mélissa, Romain, Sébastien pour leurs conseils et leurs encouragements au cours de ses années à l'IAF. J'aimerais remercier particulièrement ma conjointe et mon amoureuse Annie pour son aide, ses conseils toujours avisés, ses encouragements dans les moments difficiles et son affection. Un énorme merci à ma famille . Carol, Jacques et Audrey ainsi qu'à ma belle-famille : Lucie, Marcellin, Mireille, Dominique, Chantal, Michaël et Sylvain pour tous leurs encouragements durant mes études. Merci aux organismes subventionnaires IRSC, CSRNG, FRSQ et à la fondation Armand-Frappier pour avoir financé ce projet de doctorat.

Table des matières

Remerciements.....	IV
Liste des figures et tableaux.....	IX
Liste des abréviations.....	X
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1 Le Virus de l'hépatite C.....	2
1.1 Historique.....	2
1.2 Voie de transmission du virus de l'hépatite C.....	2
1.3 Histoire naturelle de la maladie.....	3
1.4 Classification et variabilité génétique du virus de l'hépatite C	4
1.5 Systèmes de réPLICATION et d'infection du virus de l'hépatite C	9
1.5.1 Système du réplicon	9
1.5.2 Système des pseudo-particules	10
1.5.3 Système des particules infectieuses	12
1.6 Organisation du génome du virus de l'hépatite C	14
1.6.1 5' NCR.....	14
1.6.2 3'NCR	15
1.6.3 Initiation de la traduction médiée par le IRES	15
1.6.4 Clivage protéolytique de la polyprotéine virale.....	16
1.7 Les protéines virales du VHC	16
1.7.1 Core.....	16
1.7.2 E2	17
1.7.3 P7	17
1.7.4 NS2	18
1.7.5 NS3 et NS4A.....	18
1.7.6 NS4B.....	19
1.7.7 NS5A.....	19
1.7.8 NS5B.....	20
2 Structure et composition des virions	22
3 Entrée et récepteurs du VHC	23

3.1	La proprotéine convertase PCSK9 et CD81.....	26
4	Le complexe de réPLICATION du VHC	29
4.1	RéPLICATION virale et autophagie.....	31
5	Assemblage et relargage des virions	34
6	Défenses antivirales de la cellule.....	36
6.1	Mécanismes d'évasion du VHC.....	38
7	Approches thérapeutiques actuelles et futures du VHC	38
8	Les modèles animaux dans l'étude du VHC	42
8.1	Le chimpanzé	42
8.2	Le modèle du rat immunotolérant	43
8.3	Le modèle de la souris Trimera.....	44
8.4	Le modèle de souris SCID-Aib/uPA	45
8.5	Modèles de souris FRG	48
8.6	Modèle murin chimérique et immunocompétent	51
8.7	Modèle de souris transgéniques et xénogreffe d'hépatocarcinomes humains ...	53
	CHAPITRE 2 : PREMIÈRE PUBLICATION	57
	Novel HCV replication mouse model using human hepatocellular carcinoma xenografts.	
	Guévin C, Lamarre A, Labonté P. Antiviral Res. 2009 Oct;84(1):14-22.....	58
	Résumé de la première publication.....	58
	Contribution des auteurs	59
	Abstract	62
1.	Introduction	63
2.	Materials and methods.....	65
3.	Results	73
4.	Discussion.....	79
	Figure legends	82
	Acknowledgements.....	85
	References.....	86
	Figures.....	89
	CHAPITRE 3 : DEUXIÈME PUBLICATION	97

Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection. Guévin C, Manna D, Bélanger C, Konan KV, Mak P, Labonté P. <i>Virology</i> . 2010 Sep 15;405(1):1-7.....	98
Résumé de la deuxième publication :	98
Contribution des auteurs	99
Abstract	101
Introduction.....	102
Results.....	104
Discussion.....	109
Materials and methods	111
Figure legends.....	119
Acknowledgments.....	121
References.....	122
Figures.....	126
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	131
9 Discussion.....	132
9.1 Développement et caractérisation d'une lignée hépatocytaire humaine tumorigénique.....	133
9.2 Virémie et réplication virale du VHC dans le modèle de xénogreffe murin d'hépatocarcinome humain	137
9.3 Validation du modèle animal	139
9.4 Perspectives	140
9.4.1 Étude de l'efficacité antivirale de la protéine PCSK9 <i>in vivo</i>	140
9.4.2 Effet de l'inhibition de la protéine autophagique ATG5 sur la réplication du VHC <i>in vivo</i>	141
9.5 Discussion de la deuxième publication : Rôle de la protéine autophagique ATG5 dans la réplication du VHC	142
9.6 Conclusion générale	145
Appendice A	147
Article co-auteur: PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. Labonté P, Begley S, Guévin C, Asselin MC, Nassoury N, Mayer G, Prat A, Seidah NG. <i>Hepatology</i> . 2009 Jul;50(1):17-24.....	147

Contribution: production des stocks de virus VHC JFH1 et J6/JFH1. Mise au point de méthodes de détection du VHC : immunobuvardage de type western, immunofluorescence et de RT-PCR en temps réel (Taqman).....	147
Appendice B.....	177
Résultats supplémentaires.....	177
Appendice C.....	181
Production des stocks d'adénovirus recombinants PCSK9 en vue de leur utilisation ultérieure dans le modèle animal du VHC.....	181
10 Références.....	185
11 Publications et communications scientifiques	210

Liste des figures et tableaux

Figure 1 Organisation du génome <i>Flaviviridae</i>	6
Figure 2 Arbre phylogénétique du VHC.....	8
Figure 3 Prévalence du VHC dans le monde (pays).....	9
Figure 4 Systèmes pour l'étude de la réPLICATION et de l'entrée du VHC	11
Figure 5 Génération du virus JFH1(HCVcc) en culture cellulaire	13
Figure 6 Organisation génomique et clivage de la polyprotéine du VHC	14
Figure 7 Modèle de l'initiation de la traduction par le IRES du VHC	16
Figure 9 Modèle d'entrée et cycle de réPLICATION du VHC dans l'hépatocyte	26
Figure 10 Effet du niveau d'activité de PCSK9 sur les taux de cholestérol plasmatique	27
Figure 11 Représentation schématique des domaines de PCSK9.....	27
Figure 12 Machinerie moléculaire de la formation de l'autophagosome	32
Figure 13 Réponse immunitaire innée à l'infection au VHC et mécanismes d'évasion utilisés par le VHC.....	37
Figure 14 Réponses virologiques au traitement PEG-IFN α et ribavirine chez les patients infectés par le VHC.....	39
Figure 15 Modèle du rat immunotolérant.....	44
Figure 16 Le modèle de souris Trimera.....	45
Figure 17 Modèle de souris SCID/Alb-uPA.....	46
Figure 18 Voie catabolique de la tyrosine	49
Figure 19 Le modèle de la souris FRG	50
 Figure S 1 Cinétique d'infection au VHC JFH1 des lignées cellulaires Huh7 et HuT7-3.	
.....	178
Figure S 2 Comparaison entre le titre viral du VHC (GE /ml) et la quantité de protéine PCSK9 (ng/ml) dans le sang des individus infectés par le virus avant traitement (n=50)	
.....	180
Figure S 3 Expression de l'EGFP dans les cellules 293 suite à l'infection par des adénovirus recombinants.	182
Figure S 4 Immunobuvardage montrant la protéine PCSK9-V5 sécrétée dans le surnageant des cellules 293 suite à l'infections par deux stocks viraux d'adénovirus PCSK9.....	83
Figure S 5 Super infection avec l'adénovirus eGFP et VHC JFH1 dans les cellules tumorigéniques Huh7.7.....	84
 Tableau 1 Comparaison entre les souris FRG et Alb-uPA	51
Tableau S 1 Caractéristiques des différentes souches de souris immunodéficientes utilisées lors des expériences de xénogreffes de cellules d'hépatocarcinome.....	79

Liste des abréviations

AG : adénine-guanine

ALAT : Alanine Amino Transférase

ApoB : apolipoprotéine B

ApoE : apolipoprotéine E

ARFP : alternate reading frame proteins

ARN : acide ribonucléique

ASAT : Aspartate Amino Transférase

CHC : carcinomes hépatocellulaires

CR : complexe de réPLICATION

cLDs : gouttelettes lipidiques cytosoliques

DGAT1 : diacylglycerol acyltransferase-1

EMCV : virus de l'encéphalomyocardite

G418 : généticine

Gag : protéine de la capsid et de la matrice du HIV

GE : génome équivalent

GFP : green fluorescent protein

h : heure

HIV : virus de l'immunodéficience humaine

HRV1 : région hypervariable 1

Hsc70 : heat shock cognate protein 70

HVNANB : hépatites virales non-A, non-B

IFN : interferon

IRES : internal ribosome entry site

Kpb : kilo paires de bases
LDs : gouttelettes lipidiques
LTR : Long terminal repeat
MHV : virus de l'hépatite murine
MOI : multiplicity of infection
MTP : microsomal triglycéride transport protein
NCR : régions non codantes
NK : natural killer cells
NKT : natural killer T
Pol : transcriptase inverse intégrase protéase du HIV
OAS : 2'-5'-oligoadenylate synthétase
ORF : cadre de lecture ouvert
RE : réticulum endoplasmique
SRV : réponse virale soutenue
TFR : récepteur de la transferrine
TLRs : toll-like receptors
TM : domaine transmembranaire
UTR : région non transcrrite
VHB : virus de l'hépatite B
VHC : virus l'hépatite C
VHC_{pp} : pseudo-particules du VHC
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VLP : virus-like-particules
VSV : virus de la stomatite vésiculeuse
VSV_{pp} : pseudo-particules du VSV

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1 Le Virus de l'hépatite C

1.1 Historique

Les hépatites virales sont la cause majeure des cirrhoses et des carcinomes hépatiques. En 1970, le virus de l'hépatite B a été découvert, puis peu après en 1973 le virus de hépatite A (Dane, Cameron, and Briggs, 1970; Feinstone et al., 1974). Durant cette décennie, l'Organisation mondiale de la santé a constaté que la réserve mondiale de sang était contaminée par un agent étiologique majeur des hépatites virales post-transfusionnelles et sporadiques non-A, non-B (HVNANB). Ce n'est qu'en 1989 que Michael Houghton, de la compagnie Chiron inc. identifia le génome du nouveau virus responsable des HVNANB, le virus l'hépatite C (VHC) (Choo et al., 1990). Les difficultés rencontrées pour son identification avaient amenées l'idée qu'il se répliquait très faiblement dans l'organisme infecté. Or, des études cliniques de modélisation et de cinétique ont prouvé le contraire : les patients chroniquement infectés ont de 10^3 à 10^7 génomes/mL de sérum et le VHC s'y réplique avec une efficacité de l'ordre de 10^{12} virus par jour chez un patient et avec une demi-vie d'environ 3 heures, soit 100 fois plus que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Neumann et al., 1998).

1.2 Voie de transmission du virus de l'hépatite C

Présentement, environ 2% de la population mondiale est infectée par le VHC. La transmission du virus se fait par voie parentérale. En général, les patients atteints du VHC ont été infectés par l'utilisation non contrôlée de drogues injectables, par transfusion sanguine ou par contact avec un produit dérivé du sang (Aach et al., 1980; Thomas et al., 2000). Ces derniers cas d'infections sont plus rares aujourd'hui, puisque dans les pays développés les banques de sang participent à des programmes de contrôle sévères pour la détection d'agents infectieux. Les patients ayant besoin de soins à long terme, comme les patients hémodialysés, sont plus à risque de contracter le VHC si les stratégies de prévention des infections ne sont pas appliquées (Polish et al., 1993). La transmission verticale (mère-enfant) est limitée, les taux d'infections sont estimés à 5% chez les enfants et jusqu'à 30% chez les mères co-infectées avec le VIH (Thaler et al., 1991). Toutefois, la transmission du virus par le biais de contacts sexuels reste controversée. Les

risques d'infection par cette voie existent, mais sont très faibles (Kao et al., 2000). La stabilité du VHC sur une surface de type inerte est relativement faible comparativement au VHB. Dans une étude expérimentale, un inoculum du VHC ayant séché 16 h dans une chambre pressurisée est demeuré infectieux auprès des chimpanzés, mais s'est avéré inactivé après quatre jours dans les mêmes conditions (Kamili et al., 2007).

1.3 Histoire naturelle de la maladie

Lorsque le VHC infecte le foie, il entraîne une hépatite aiguë souvent asymptomatique ou légère : fatigue, jaunisse, douleur abdominale, etc. Au cours de la phase aiguë, l'ARN viral devient détectable dans le sérum de 7 à 21 jours après l'infection (Bowen and Walker, 2005). Une élévation du taux des aminotransférases (ALAT, ASAT) dans le sérum est généralement observée avec un pic apparaissant 4 à 8 semaines suite à l'infection. La séroconversion survient entre 20 et 150 jours après la contamination (Grange, 2002). Dans 10 à 20% des cas, les patients guérissent spontanément (Tong and el-Farra, 1996).

Dans 80% des cas, l'infection par le VHC devient chronique. L'infection chronique se traduit par la persistance de la réPLICATION virale et la présence durable de l'ARN viral dans le sérum (Yeo et al., 2001). Environ la moitié des gens ont des taux enzymatiques en ALT/ASAT normaux et les analyses de biopsies hépatiques révèlent une hépatite chronique minime et des signes de fibrose légère. Sur le plan clinique, les symptômes sont peu spécifiques. L'évolution à long terme de la fibrose hépatique conduit dans 20% des cas au développement d'une cirrhose dans un délai de 10 à 20 ans et les chances d'évolution vers un carcinome hépatocellulaire sont de 3% par année (Lauer and Walker, 2001). Outre le tropisme hépatique du VHC, certaines études suggèrent l'existence d'une réPLICATION dans des réservoirs extra-hépatiques, incluant les lymphocytes du sang périphérique, les cellules intestinales et le système nerveux central, mais ces études sont controversées (Maggi et al., 1999; Muller et al., 1994; Pham et al., 2005; Sarhan et al., 2012). Ainsi, 5 à 10% des patients infectés chroniquement développent des pathologies extra-hépatiques : en particulier la cryoglobulinémies (complexe antigènes-anticorps), des lymphomes, des problèmes cutanés et des maladies auto-immunes (Agnello and De Rosa, 2004).

1.4 Classification et variabilité génétique du virus de l'hépatite C

La famille *Flaviviridae* est divisée en trois genres : *Flavivirus*, *Pestivirus* et *Hepacivirus*. Les flavivirus incluent le virus de la fièvre jaune, le virus de la dengue, le virus de l'encéphalite japonaise et le virus des encéphalites transmises par les tiques. Les pestivirus incluent le virus de la diarrhée virale bovine, la peste porcine classique et le virus de la maladie de la frontière (Border disease). Le VHC fait partie de la famille hépacivirus, qui inclue également le virus du tamarin, le virus GB B (GBV-B) et le virus humain GB C (GBV-C). Le VHC est composé de sept génotypes et de nombreux sous-types (Lindenbach and Rice, 2003; Nakano et al., 2012).

Les membres de la famille *Flaviviridae* partagent certains aspects structuraux et caractéristiques virologiques. Ils sont tous enveloppés d'une membrane bilipidique dans laquelle deux ou plusieurs protéines de l'enveloppe sont enracinées. L'enveloppe enrobe la nucléocapside qui est composée de nombreuses petites protéines basiques (core ou C) et contient le génome d'ARN. Le génome des *Flaviviridae* est composé d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive variant entre 9.6 et 12.3 kpb avec un cadre de lecture ouvert (ORF) codant pour une polyprotéine de 3000 acides aminés et plus (Miller and Purcell, 1990).

Les protéines structurales sont codées par la partie N-terminale de l'ORF alors que la portion C-terminale de l'ORF code pour les protéines non structurales (Figure 1). Les séquences d'ARN de la protéase-hélicase et de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp), qui contiennent des motifs conservés, sont localisées à des endroits similaires de la polyprotéine les virus de la famille *Flaviviridae* (Miller and Purcell, 1990). De plus, les polyprotéines des virus membre de la famille *Flaviviridae* partagent un profil d'hydropaticité similaire, dans lequel les virus du genre *Flavivirus* possèdent une plus grande homologie avec les hépacivirus qu'envers les pestivirus (Choo et al., 1991). L'ORF est flanqué par 2 régions non codantes variables, 5'NC (95 à 555 nt) et 3'NC (114 à 614 nt), qui jouent un rôle essentiel dans la réPLICATION et dans la traduction de la polyprotéine (Thurner et al., 2004).

Tous virus membre de la famille *Flaviviridae* ont un cycle de réPLICATION similaire. Sommairement, les membres de la famille *Flaviviridae* lient un ou plusieurs récepteur(s) cellulaire(s) spécifique(s) organisés en un complexe et cette liaison produit l'endocytose médiée par les récepteurs. La fusion de l'enveloppe du virion avec les membranes cellulaires libère la nucléocapside dans le cytoplasme (Rice and Lindenbach, 2001). Après la décapsidation, la traduction du génome viral a lieu dans le cytoplasme de la cellule, menant à la production d'un précurseur de la polyprotéine. La polyprotéine va ensuite être clivée par des protéases cellulaires et des protéases virales pour produire les protéines structurales et non-structurales (Rice and Lindenbach, 2001). La réPLICATION du génome du virus se fait via le complexe de réPLICATION qui est associé aux membranes cellulaires. La réPLICATION virale se fait dans le cytoplasme par la synthèSE d'un brin intermédiaire d'ARN négatif pleine longueur. Les nouveaux virions sont assemblés dans des vésicules cytoplasmiques formées par le bourgeonnement de membranes intracellulaires. Finalement, les virions matures vont être libérés dans le milieu extracellulaire par exocytose (Rice and Lindenbach, 2001).

Malgré ses nombreuses similarités avec les autres membres des *Flaviviridae*, le VHC demeure différent au point de vue virologique, pathologique et épidémiologique. Par exemple, la traduction des membres de la famille *Flavivirus* est dépendante de la présence d'une coiffe de type 1, localisée dans la structure 5'NCR (m^7 GpppAmp), qui est suivie d'une séquence conservée en acides nucléiques AG et d'un petit segment en amont de la région codante de la polyprotéine (Brinton and Dispoto, 1988). Contrairement aux flavivirus, le VHC ne possède pas de coiffe et, comme les pestivirus et le virus GB, forme une structure secondaire d'ARN liée à une portion du domaine de la région codante de core appelée IRES (internal ribosome entry site) (Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Cette structure IRES médie la liaison directe des sous-unités ribosomales et des facteurs cellulaires et régule subséquemment la traduction. Bien que les flavivirus ont une région 3'NCR très structurée, la région 3'UTR du VHC demeure assez courte, simple et contient une chaîne poly-uridyle de longueur variable (Blight and Rice, 1997).

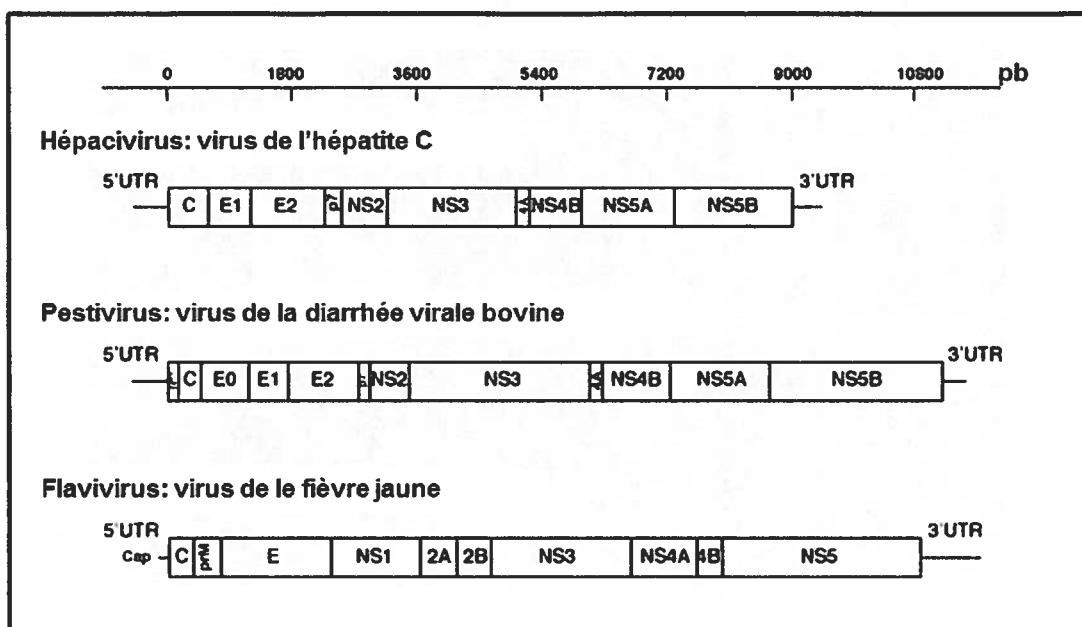


Figure 1 Organisation du génome *Flaviviridae*
Adapté de Chevaliez S. et Pavlotsky P.M., 2007.

Le VHC a une spécificité d'hôte étroite et un tropisme tissulaire bien spécifique. Le VHC se transmet exclusivement par contacts avec du sang ou des liquides organiques infectés. Les flavivirus sont principalement véhiculés par les moustiques ou les tiques et peuvent infecter un large éventail d'animaux vertébrés où les humains sont considérés comme l'hôte final qui ne participe pas à la perpétuation de la transmission du virus. Aucun pestivirus connu ne peut infecter les humains et aucun insecte comme vecteur de transmission n'a été identifié. Les infections causées par les flavivirus sont aiguës et limitées chez les animaux vertébrés, alors que le VHC a un taux de chronicité élevée chez les humains (75%-80%). Lors des infections avec les flavivirus et les pestivirus, des réponses immunitaires humorale et cellulaire fortes et adaptées semblent être impliquées dans les phases de récupération et de protection suivant l'infection. Cependant, l'infection par le VHC induit une réponse immunitaire qui ne parvient pas à éliminer le virus dans la plupart des cas et ne confère aucune protection contre une réinfection par des souches homologues et hétérologues dans le modèle du chimpanzé (Farci, Bukh, and Purcell, 1997).

L'infection par le VHC est un processus dynamique où la demi-vie du virus est de seulement quelques heures. Chez un individu infecté, la production et l'élimination du virus est estimé à 10^{12} virions par jour (Neumann et al., 1998). La grande variabilité génétique du VHC est due principalement à sa grande activité réplicative et au taux d'erreur élevé de la polymérase virale. Ces caractéristiques du VHC sont similaires à celles du VIH et soutiennent des approches rationnelles pour le développement d'agent antiviraux et de thérapies combinatoires.

Les isolats du VHC sont classés en génotypes et sous-types (Simmonds, 2004; Simmonds et al., 2005) (Figure 2). Il existe sept génotypes majeurs qui diffèrent de 30-35% dans leur séquence nucléotidique (Nakano et al., 2012). Les patients infectés par le génotype 1 ne répondent pas aussi bien aux traitements à l'interféron- α /ribavirine comparativement à ceux infectés par un génotype 2 ou 3. Un génotype se définit par plusieurs sous-types (désignés a, b, c, etc.), qui diffèrent de 20-25% dans leur séquence nucléotidique. Le concept de quasi-espèces a été appliqué à la virologie pour décrire les caractéristiques de certains virus à ARN (Eigen, 1971). La quasi-espèce désigne une population de variant viraux, présente chez un individu donné à un instant. Chez un individu infecté par le VHC, des quasi-espèces peuvent coexister formant une hétérogénéité génétique de la population des génomes du VHC chez le patient (Simmonds et al., 2005). Bien que l'ensemble du génome puisse montrer une variabilité génétique, des régions où la fréquence des mutations est très élevées ont été identifiées. De nombreuses mutations ont lieu dans la région hypervariable (HVR1) de la protéine de l'enveloppe du virus (Kumar et al., 1993). On suppose que cette région hypervariable favorise l'infection chronique du VHC; ces mutations permettent ainsi au virus d'échapper aux anticorps neutralisants (Osburn et al., 2010).

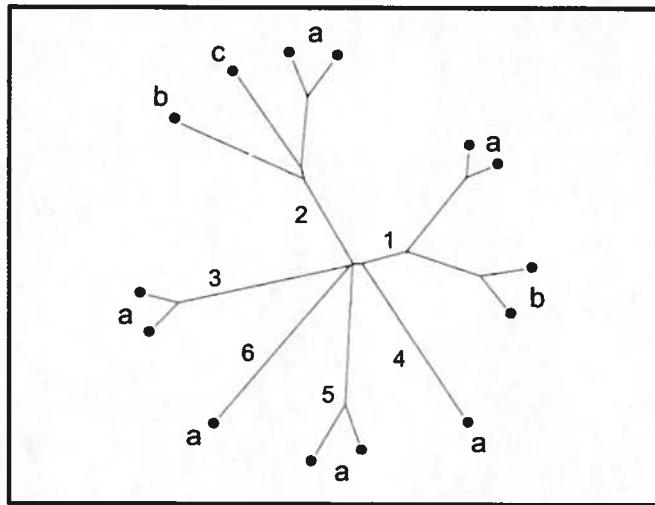


Figure 2 Arbre phylogénétique du VHC
Adapté de Simmonds P. et al, 2004.

À travers le monde, la prévalence des génotypes VHC diffère selon la région géographique (Figure 3). Aux États-Unis et en Europe, le génotype le plus commun est le génotype 1 (représentant environ 70% des cas d'infections) suivi des génotypes 2 et 3. Le génotype 3 est plus commun dans certaines parties de l'Europe, mais aussi en Angleterre, Thaïlande, Inde et Australie. Le génotype 4 est trouvé presque exclusivement au Moyen-Orient. En Égypte, environ 22% de la population est infectée par le VHC et cette prévalence élevée serait dû à une campagne de traitement contre la schistosomiase lors de laquelle l'utilisation de seringues réutilisables et d'aiguilles usagées aurait largement contribué à la contamination des habitants (Frank et al., 2000). Le génotype 5 est exclusivement retrouvé en Afrique du Sud et le 6 est largement représenté en Asie du sud et en Australie. Le génotype 7 a été découvert récemment au Canada (Nakano et al., 2012).

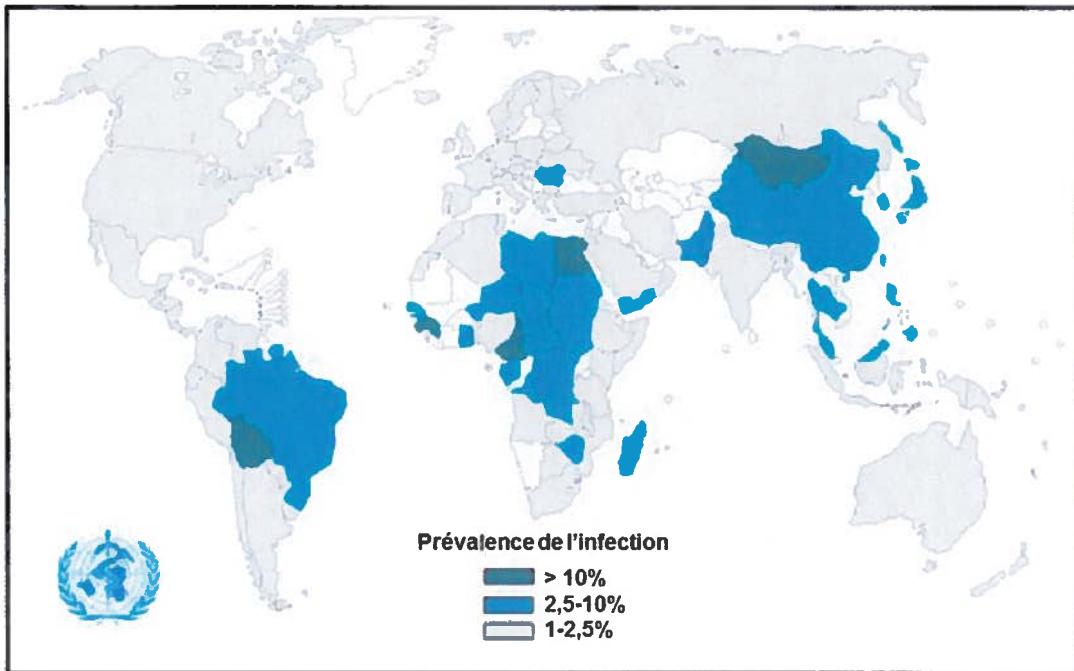


Figure 3 Prévalence du VHC dans le monde (pays)
Lavanchy C. et al., 2009

1.5 Systèmes de réPLICATION ET D'INFECTION DU VIRUS DE L'HÉPATITE C

1.5.1 Système du réplicon

Le premier modèle de culture cellulaire pouvant supporter la réPLICATION autonome du VHC a été développé en 1999, soit dix ans après l'indentification du VHC comme étant la cause des hépatites transfusionnelles non-A, non-B (Choo et al., 1989). Le développement du système de réplicon a été une découverte majeure dans le domaine de l'hépatite C (Lohmann et al., 1999). Ce système permet la réPLICATION *in vitro* d'une séquence d'ARN sous-génomique du VHC portant les régions 5'UTR, NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B et 3'UTR (isolat Con1, Figure 4 A). La partie structurale du réplicon sous-génomique est remplacée par le gène de la néomycine phosphotransférase (Figure 4 A, Neo représenté en bleu). La traduction des protéines non-structurales (3-5B) est initiée par un deuxième IRES hétérologue provenant du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV). Pour la première, fois il était possible étudier la réPLICATION du VHC *in vitro* dans la lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain Huh7. L'inefficacité de l'initiation de la réPLICATION de l'ARN limitait l'utilisation de ce système. Blight et al. ont amélioré le

système de réPLICATION en traitant un sous-clone de la lignée Huh7 à l'interféron- α , ce qui eut pour effet d'augmenter grandement la permissivité de l'ARN du VHC dans la cellule. Ce sous-clone de la lignée cellulaire Huh7, nommé Huh7.5, contient une déficience dans le gène inductible de l'acide rétinoïque 1 (RIG-1) impliqué lors de la réponse antivirale cellulaire (Blight, McKeating, and Rice, 2002).

D'autres réplicons d'isolats de génotype 1b ont été développés plus tard ainsi que le génotype 1a (isolat H77) et le 2a (isolat JFH1). Une des caractéristiques principales des réplicons de génotype 1 est qu'ils ont besoin de mutations adaptatives au niveau des protéines NS afin de bien se répliquer en culture cellulaire (Bartenschlager and Sparacio, 2007). Malheureusement, les réplicons pleine longueur possédant les mutations adaptatives se sont avérés non infectieux en culture cellulaire. Lorsque ces mutations sont ajoutées, les taux de réPLICATION de l'ARN viral sont augmentés de plusieurs magnitudes mais semblent interférer avec l'assemblage des virions (Pietschmann et al., 2009). Une corrélation inverse a été montrée entre les niveaux de réPLICATION de l'ARN viral dans les cellules Huh7 et la réPLICATION du virus *in vivo* suite à l'inoculation intra-hépatique de l'ARN chez le chimpanzé. Plus précisément, les réplicons les mieux adaptés en culture cellulaire (mutations dans la NS3 et NS5A) étaient peu ou pas infectieux *in vivo* (Bukh et al., 2002).

1.5.2 Système des pseudo-particules

L'incapacité de pouvoir étudier le cycle complet de réPLICATION du VHC a amené la communauté scientifique à développer d'autres systèmes pour étudier le virus. Par exemple, la sécrétion de la forme tronquée en C-terminal de la protéine E2 a mené à l'indentification des principaux récepteurs et des interactions entre la cellule et le VHC (Flint et al., 1999; Pileri et al., 1998; Scarselli et al., 2002). D'autres systèmes intéressants ont été développés pour étudier les fonctions de la protéine de l'enveloppe comme l'expression de E2 à la surface des cellules, les liposomes E1-E2, les virus-like-particules (VLP) produits dans les cellules d'insectes et le système du virus de la stomatite vésiculeuse pseudotypée avec des glycoprotéines chimériques (VSVpp), constituant l'ectodomaine de E1-E2 du VHC, fusionné au domaine transmembranaire (TM) de la

glycoprotéine G du VSV (Cocquerel et al., 2002; Matsuura et al., 2001; Triyatni et al., 2002).

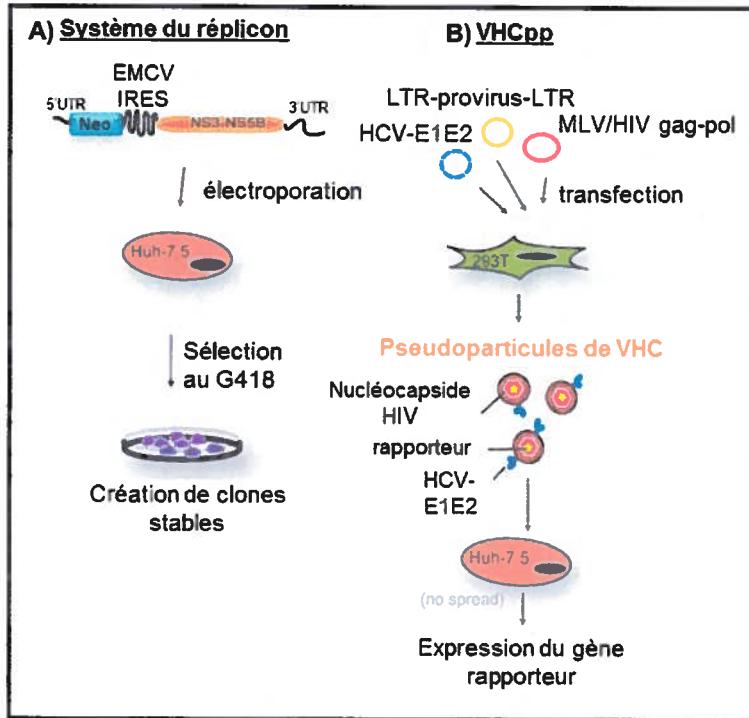


Figure 4 Systèmes pour l'étude de la réplication et de l'entrée du VHC
(A) Système du réplicon du VHC permettant la réplication de l'ARN viral en culture cellulaire. (B) Système de pseudo-particules du VHC permettant l'étude du rôle des glycoprotéines dans le cycle de réplication du VHC. *Adapté de Tellinghuisen T. et al. 2007.*

L'une des découvertes majeures dans l'étude des mécanismes d'entrée du VHC a été la génération de pseudo-particules rétrovirales exprimant les protéines de l'enveloppe native du VHC sur la capsidé d'un rétrovirus murin (VHCpp) (Bartosch, Dubuisson, and Cosset, 2003; Hsu et al., 2003; Tellinghuisen et al., 2007). Pour générer les VHCpp, des cellules 293T (cellules embryonnaires de rein humain) sont co-transférées avec trois vecteurs d'expression (Figure 4 B) : un vecteur d'expression codant pour les protéines d'enveloppe E1/E2 et la partie C-terminale de la protéine core qui sert de peptide signal à la protéine E1, un vecteur portant les gènes Gag et Pol du virus MLV ou du virus HIV, ainsi qu'un vecteur permettant l'incorporation d'un gène rapporteur (GFP ou luciférase, bordé de LTR). Le gène rapporteur sera exprimé dans les cellules infectées par les VHCpp. Finalement, ce modèle de pseudo-particules du VHC a permis d'étudier les

étapes d'entrées du virus dans la cellule ainsi que l'identification et la caractérisation des récepteurs et co-récepteurs du VHC (Bartosch, Dubuisson, and Cosset, 2003).

1.5.3 Système des particules infectieuses

Récemment, Kato *et al.* ainsi que Date *et al.* ont identifié un isolat du VHC où l'ARN était capable de se répliquer efficacement dans de multiple lignées cellulaires sans mutations adaptatives (Date et al., 2004; Kato et al., 2003; Kato et al., 2005). Cette souche génotypique 2a, appelée JFH1, a été isolée d'un patient japonais présentant une hépatite fulminante. Le point crucial de cette découverte est que la transfection du génome complet de JFH1 dans les cellules Huh-7 permet la production de particules virales infectieuses (VHCcc) (Wakita et al., 2005a). L'infectiosité des VHCcc a été démontrée à la fois sur des lignées hépatocytaires et chez le chimpanzé. Ce système fut amélioré afin d'accroître les titres du virus JFH1 en utilisant des cellules traitées à l'interféron- α (clone Huh7.5 « cured cell ») (Zhong et al., 2005a). Ces cellules semblent constituer un système efficace pour la production de particules virales *in vitro*. Ce fut le premier système infectieux à être utilisé pour étudier l'entrée du virus produit *in vivo* (Lindenbach et al., 2006; Wakita et al., 2005a).

La production de particules virales infectieuses à partir d'un génome du VHC chimère résultant du remplacement de la partie structurale de JFH1 à la jonction C-NS2 par la séquence correspondante au virus J6 (génotype 2a) a également été développée (Figure 5) ainsi que d'autres chimères (1a, 1b, 3a, 4a et 6a). La réPLICATION de J6/JFH1 est inhibée par l'interféron- α et les titres viraux obtenus avec ce virus chimère sont plus élevés qu'avec JFH1. Le virus J6/JFH1 est infectieux chez la souris SCID Alb-uPA transplantée avec des hépatocytes humains ainsi que chez le chimpanzé. Après passage chez ces animaux, J6/JFH1 reste infectieux en culture cellulaire (Lindenbach et al., 2006). Le virus provenant des animaux infectés devient plus infectieux et acquiert certaines propriétés biophysiques. Cette découverte s'avère importante puisqu'elle suggère que l'interaction entre le VHC et les lipoprotéines du sérum contribue à augmenter l'infectiosité du virus (Lindenbach et al., 2006).

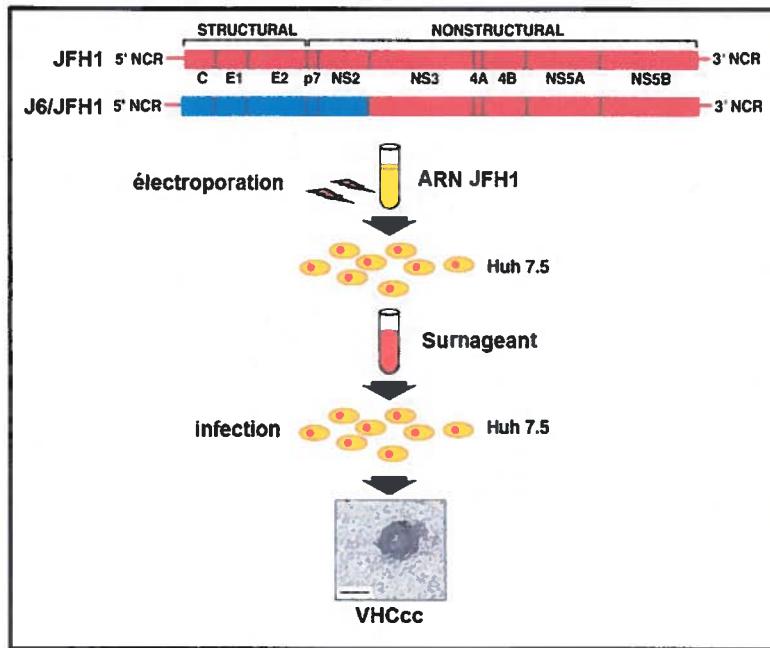


Figure 5 Génération du virus JFH1(VHCcc) en culture cellulaire
Adapté de Lindenbach et al. 2006.

Comparativement à J6/JFH1, les gènes structuraux de JFH1 semblent donc présenter une plus faible capacité intrinsèque d'assemblage et/ou de libération du virus. Cette hypothèse est étayée par une étude récente où la production en culture de virus chimères intergénotypiques et intragénotypiques a été comparée à celle de JFH1. Les titres les plus élevés ont été obtenus avec le recombinant J6/JFH1, où les auteurs ont altéré la jonction de la fusion de la NS2/3 dans le premier segment du domaine transmembranaire de la NS2 (Lindenbach et al., 2005).

L'étude de ces virus chimères a permis récemment l'identification de déterminants essentiels à la production de virus *in vitro* (Binder et al., 2007). Afin de produire en culture des virus de différents génotypes, d'autres constructions comportant l'ADN complémentaire du VHC flanqué par des ribozymes ont été réalisées, mais leurs niveaux de réplication restent cependant faibles (Kato et al., 2007). De plus, Yi et al. ont mis au point la production d'un clone du VHC de génotype 1a (H77s) infectieux dans la lignée cellulaire hépatocytaire Huh7.5. Bien que ce virus possède cinq mutations adaptatives situées la région non-structurale, la production de particules infectieuses *in vitro* c'est avérée inférieure à celle du clone moléculaire JFH1 (génotype 2a) (Yi et al., 2006a).

Le modèle de culture cellulaire du VHC JFH1 constitue donc un événement majeur permettant l'étude *in vitro* du cycle viral dans son ensemble et la confirmation des données établies précédemment à partir d'autres modèles. Par ailleurs, ce système a récemment contribué à la caractérisation de nouveaux récepteurs impliqués dans l'entrée du VHC tel que la claudine-1 et l'occludine (Evans et al., 2007; Ploss et al., 2009).

1.6 Organisation du génome du virus de l'hépatite C

Le VHC à un génome de 9,6 kb à ARN simple brin de polarité positive composé de deux régions non codantes (NCR) aux extrémités 5' et 3', délimitant un cadre de lecture codant une dizaine de protéines (Figure 6): les protéines structurales (S) C, E1 E2 et p7 sont situées dans le premier tiers du génome et les protéines non structurales (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B dans les deux derniers tiers (Choo et al., 1989).

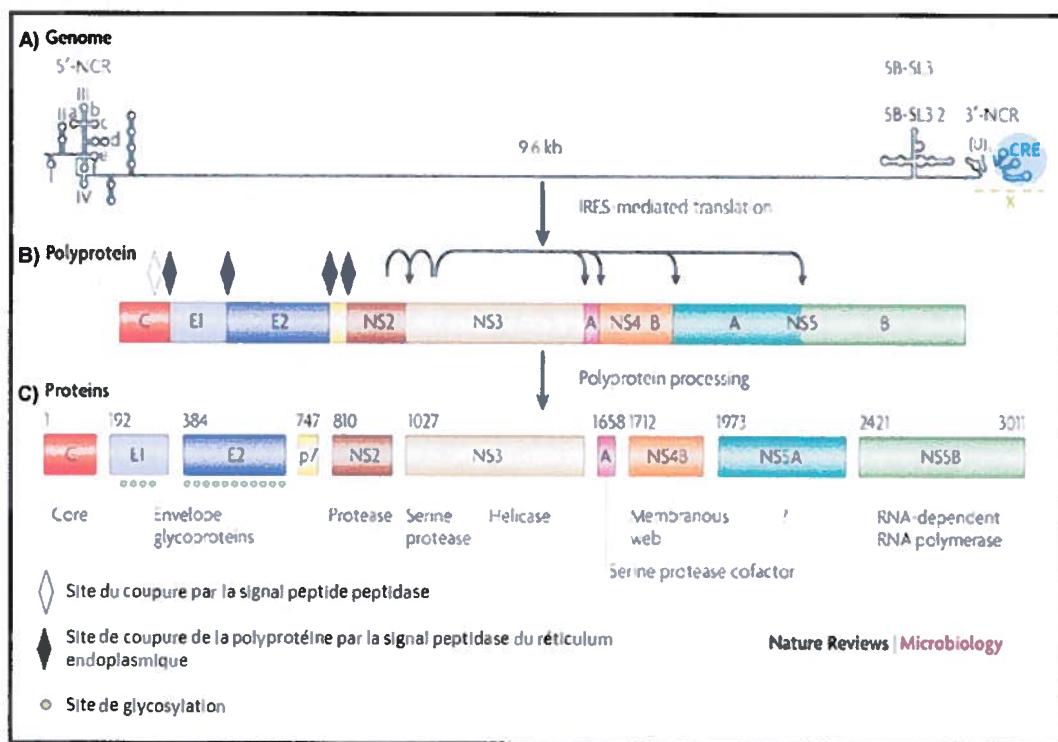


Figure 6 Organisation génomique et clivage de la polyprotéine du VHC
Adapté de Moradpour D. et al. 2007.

1.6.1 5' NCR

La partie 5' NCR est une région non codante très conservée parmi les différents isolats du VHC. Cette région contient un IRES qui est essentiel pour la traduction.

indépendante de la coiffe, de l'ARN viral. Le 5'NCR est composé de 4 domaines (I à IV) bien définis et structurés (Figure 6 A). Le domaine I n'est pas essentiel à l'activité IRES, mais est cependant requis, avec le domaine II, pour la réPLICATION de l'ARN du virus (Friebe et al., 2001). Une étude a démontré que le micro ARN (miARN) hépatique miR-122, qui est spécifiquement exprimé à un haut niveau dans le foie, peut lier le 5'NCR et augmenter la traduction virale (Jopling et al., 2005).

1.6.2 3'NCR

La partie 3'NCR est composée d'une petite région variable, d'une séquence poly(U/UC) d'environ 80 nt ainsi que d'un élément d'ARN de 98 nt presque toujours invariable désigné la région X (Kolykhalov, Feinstone, and Rice, 1996). Les éléments conservés dans la partie 3'NCR incluent une petite séquence poly(U) de 25 pb, qui s'avère essentielle à la réPLICATION *in vitro* et *in vivo* (Yanagi et al., 1999). Outre les régions 5' et 3' NCRs, un élément essentiel, l'élément réPLICATIF agissant en *cis* (CRE), a été identifié dans la séquence qui code pour la région C-terminale de NS5B (You et al., 2004). Une séquence stable repliée en boucle (tige-boucle) essentielle désignée 5B-SL3.2 a été identifiée à l'intérieur d'un élément d'ARN cruciforme plus grand désigné 5B-SL3 (Figure 6, section génome). Il a été démontré que la partie supérieure de la boucle 5B-SL3.2 interagit avec la tige-boucle de la région X suggérant la formation d'un « pseudo-nœud » en 3' du génome du VHC essentiel à la réPLICATION de l'ARN (Friebe et al., 2005).

1.6.3 Initiation de la traduction médiée par le IRES

Le IRES est constitué des domaines II, III et IV de la partie 5'-NCR ainsi que des premiers 24-40 nt de la région codante de la protéine core du virus. L'initiation de la traduction s'effectue par l'entremise de la formation d'un complexe binaire entre le IRES et la sous-unité ribosomale 40S (IRES-40S, Figure 7). Il s'en suit l'assemblage d'un complexe IRES-48S au codon d'initiation AUG une fois que le facteur d'initiation de la traduction eukaryotique (eIF2) et le complexe tertiaire (eIF2•Met-tARN_i•GTP) y sont associés. Le facteur limitant la vitesse de l'initiation est l'association, dépendante du GTP, de la sous-unité 60S pour former le complexe IRES-80S (Otto and Puglisi, 2004).

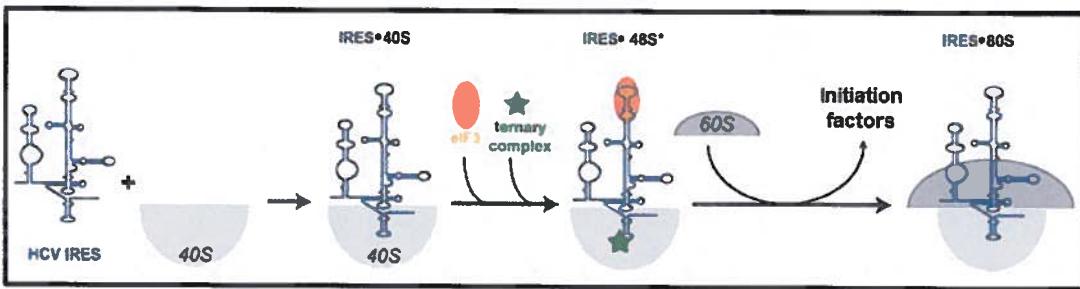


Figure 7 Modèle de l'initiation de la traduction par le IRES du VHC

Otto G.A. et Puglise J.D. 2007.

1.6.4 Clivage protéolytique de la polyprotéine virale

La traduction du cadre de lecture ouvert du VHC produit une polyprotéine (Figure 6 B), qui va subir des modifications co- et post-traductionnelles par des protéases cellulaires et virales pour créer les protéines matures structurales et non-structurales (Figure 6 C). Les protéines structurales et le polypeptide p7 sont clivés par une signal peptidase du réticulum endoplasmique (RE) alors que les protéines non-structurales sont clivées par deux protéases virales, la protéase NS2-3 et la sérine protéase NS3 (Clarke, 1997; Steinmann and Pietschmann, 2010).

1.7 Les protéines virales du VHC

1.7.1 Core

La protéine core forme la nucléocapside virale. Core est d'abord clivée par une signal peptidase, qui génère une core immature de 191 acides aminés (aa). Ensuite, une signal peptide peptidase procède à un second clivage en C-terminal et génère une protéine mature de 21 kDa (173-179 aa). Le processus du clivage et la maturation de la protéine favorisent son transport aux membranes du RE ainsi qu'à la surface des gouttelettes lipidiques (LDs), lieu présumé d'assemblage des particules du VHC (McLauchlan et al., 2002; Miyanari et al., 2007b). Par conséquent, le clivage de core par la signal peptide peptidase est important pour la production de « *virus-like particles* » et de virions infectieux (Targett-Adams et al., 2008). La protéine core est constituée d'un domaine N-terminal hydrophile (DI), impliqué dans la liaison à l'ARN, d'un domaine central hydrophobe (DII), responsable de l'association avec les gouttelettes lipidiques, et d'un domaine C-terminal qui sert de séquence signal pour la protéine E1 (Boulant et al., 2006).

De plus, un cadre de lecture ouvert alternatif, produit par un décalage du ribosome, code pour une famille de protéines reliées à core (ARFP) (Varaklioti et al., 2002; Xu et al., 2001). Différentes formes de core ont été décrites, dont plusieurs sont générées par des stratégies de traduction alternative : le décalage du cadre de lecture « *frameshift* » du ribosome , l’infidélité de transcription « *transcriptional slippage* » et l’initiation de traduction interne. Les protéines résultantes sont nommées : F « *protein frameshift* », core +1 « cadre de lecture alternatif » ou mini-core (Branch et al., 2005; Eng et al., 2009). Ces différentes formes de core ne sont pas nécessaires à la réPLICATION du virus *in vitro* et *in vivo*. Il a été démontré que le sérum et les cellules T de patients infectés répondent à la protéine ARFP/F, mais des études supplémentaires sont à faire pour déterminer l’implication de la protéine ARFP/F dans la pathogenèse du VHC (Boumlic et al., 2010; Troesch et al., 2005; Xu et al., 2001).

1.7.2 E2

L’enveloppe virale est constituée d’une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines d’enveloppe E1 et E2, responsables de la liaison des récepteurs et de l’entrée du VHC dans la cellule. Les glycoprotéines E1 (192 aa) et E2 (363 aa) sont des protéines transmembranaires de type I avec un ectodomaine N-terminal N-glycosylé et un ancrage membranaire hydrophobe carboxy-terminal. Au cours de leur maturation dans le réticulum endoplasmique, les protéines E1 et E2 s’assemblent pour former des hétérodimères non-covalents (Cocquerel et al., 2003; Michalak et al., 1997; Patel, Patel, and McLauchlan, 2001). E2 est le ligand majeur impliqué dans la liaison des récepteurs CD81 et SR-BI (récepteur scavenger de classe B type I), deux des nombreux récepteurs et co-récepteurs du VHC (Pileri et al., 1998; Scarselli et al., 2002).

1.7.3 P7

La protéine P7 est une protéine hydrophobe de 63 acides aminés. Cette protéine est composée de deux domaines transmembranaires liés à une courte boucle cytoplasmique (Carrere-Kremer et al., 2002). P7 oligomérise et forme ainsi un pore hydrophobe qui agit tel un canal ionique (viroporine) (Griffin et al., 2003; Pavlovic et al.,

2003). Sans être nécessaire à la réPLICATION de l'ARN, P7 est essentielle à l'assemblage et à la relâche des particules du VHC infectieuses *in vitro* et *in vivo* (Sakai et al., 2003).

1.7.4 NS2

NS2 est une protéine transmembranaire de 21-23 kDa. Cette protéine est composée d'un domaine transmembranaire très hydrophobe ancré à la membrane en N-terminal et d'un domaine cystéine protéase en C-terminal (Santolini et al., 1995). La portion C-terminale de la NS2 contient un domaine protéase qui, en assemblage avec la partie N-terminale du domaine protéase de la NS3, forme une protéase à activité catalytique capable de cliver la jonction NS2/3 (Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993a). La protéine NS2 ne joue pas un rôle direct dans la réPLICATION, mais est essentielle à la production des particules virales (Jones et al., 2007). La structure cristallographique de NS2 révèle la présence d'une structure dimérique et d'un site actif mixte constitué de résidus provenant de chaque monomère (Lorenz et al., 2006).

1.7.5 NS3 et NS4A

La NS3 est une protéine de 69 kDa qui possède une activité sérine protéase dans le tiers N-terminal et une activité hélicase et NTPase dans les deux tiers C-terminaux. La fonction hélicase de NS3 est nécessaire à la réPLICATION de l'ARN ainsi que dans l'assemblage des virions (Lam and Frick, 2006; Ma et al., 2008). Le domaine sérine protéase est connu pour former un hétérodimère stable avec la NS4A (NS3-NS4A). La NS4A est une petite polyprotéine de 54 acides aminés agissant comme co-facteur de la NS3 (De Francesco and Steinkuhler, 2000). L'hétérodimérisation avec NS4A va augmenter du même coup l'activité protéase et lier NS3 à la membrane intracellulaire. En plus de cliver la polyprotéine virale, la protéase NS3-NS4A a la capacité de cliver et de déloger de la membrane mitochondriale la protéine adaptatrice MAVS (*mitochondrial antiviral signalling protein*), aussi connue sous les noms de IPS-1 (INF- β promoter stimulator-1), VISA (*virus-induced signaling adaptor*) et CARDIF (*caspase recruitment domain adaptor inducing INF- β*). Ce clivage joue un rôle important dans la régulation de la voie de signalisation de l'immunité innée (Figure 12). La protéase NS3-NS4A peut aussi cliver TRIF (*Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein*

inducing IFN- β), une protéine adaptatrice des récepteurs TLR 3 (*Toll-like receptor*) (Foy et al., 2005; Li et al., 2005b; Seth, Sun, and Chen, 2006). L'importance de la NS3-NS4A dans la persistance et la pathogenèse de l'hépatite chronique jumelé à son rôle dans la régulation de l'immunité innée rend celle-ci attrayante comme cible thérapeutique spécifique contre VHC (Garber, 2007).

1.7.6 NS4B

La protéine NS4B fait environ 27 kDa et demeure peu caractérisée jusqu'à maintenant. Lors du cycle répliquatif du VHC, les protéines non-structurales du virus s'organisent en complexe de réplication à proximité du RE. Cette organisation particulière semble être responsable d'un réarrangement des membranes en structure vésiculaire appelée « *membranous web* » (Egger et al., 2002). Des études antérieures ont suggéré que la protéine transmembranaire NS4B du VHC pouvait intervenir directement dans la formation de ces structures membranaires. De plus, il a été montré que NS4B peut lier directement l'ARN viral et que des composés pouvant bloquer cette liaison inhibent également la réplication virale (Einav et al., 2008). La partie C-terminale de la NS4B possède un site de liaison GTP et deux résidus cystéines palmitoylés. Cependant, le mécanisme avec lequel la palmitoylation ou la liaison des NTP s'effectue pour faciliter la réplication du VHC demeure encore inconnu (Einav et al., 2004; Yu et al., 2006). Finalement, il a été montré que la NS4B s'associe avec Rab5 dans les cellules contenant un réplicon du VHC. Rab5 est une protéine cellulaire localisée dans les endosomes précoces et elle est possiblement impliquée dans la formation du complexe de réplication (CR) (Stone et al., 2007).

1.7.7 NS5A

La NS5A ne contient pas de domaine transmembranaire. Elle est plutôt attachée à la membrane intracellulaire par une hélice en N-terminal insérée horizontalement à la double couche lipidique (Elazar et al., 2003). NS5A existe sous une forme mature de poids apparent de 56 kDa et également sous une forme hyperphosphorylée de 58 kDa (Kaneko et al., 1994). De nombreuses études montrent l'importance du statut de phosphorylation de la NS5A dans la réplication virale. Il a été observé que des mutations

adaptatives empêchant la phosphorylation de la NS5A et d'autres protéines NS augmentent la réPLICATION virale (Appel, Pietschmann, and Bartenschlager, 2005; Evans, Rice, and Goff, 2004). De même, il a été démontré que des inhibiteurs sélectifs de la phosphorylation de la NS5A stimulent la réPLICATION de l'ARN du VHC sous-génomique Con1 (séQUENCE sauvage) en culture cellulaire (Neddermann et al., 2004).

La protéine NS5A est importante pour l'assemblage des particules virales infectieuses en culture cellulaire. La suppression du domaine III en C-terminal, ou précisément la substitution de trois résidus sérines en alanines (cluster) dans le domaine III, abolit la production de virus infectieux dans le système VHCcc (Masaki et al., 2008). La protéine NS5A interagit avec de nombreuses protéines cellulaires impliquées dans la réPLICATION du virus. Par exemple, l'interaction entre la NS5A et la hVAP-A (*human vesicle-associated membrane protein-associated protein A*) est régulée par la phosphorylation de la NS5A et pourrait être impliquée dans la formation du complexe de réPLICATION (CR) (Gao et al., 2004a). Un certain nombre d'autres protéines associées à la NS5A, comme la protéine géranylgeranylée F-box FBL2, VAP-B, FKBP8, le domaine TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) de la Rab GAP (*GTPase-activating protein*) TBC1D20 et FBP (FUSE (*far upstream element of the c-myc proto-oncogen-binding protein*)), sont également nécessaires à la réPLICATION du VHC (Hamamoto et al., 2005; Sklan et al., 2007; Wang et al., 2005; Zhang, Harris, and Pandey, 2008). Par ailleurs, une publication récente a montré l'utilisation d'un inhibiteur puissant de la NS5A capable de supprimer la réPLICATION du VHC à des concentrations entre 9 et 50 pM. Cette approche thérapeutique souligne l'importance de cette protéine virale dans le cycle de vie du virus (Nettles et al., 2011).

1.7.8 NS5B

La NS5B est une protéine hydrophile de 68 kDa qui contient l'activité ARN polymérase, dû à la présence d'un motif GDD (Gly-Asp-Asp) dans sa séQUENCE, caractéristique des polymérases ARN dépendantes des virus à ARN positif (RdRp) (Poch et al., 1989). L'activité ARN polymérase est essentielle à la réPLICATION de l'ARN génomique viral. Cette réPLICATION implique la synthèse d'un intermédiaire de réPLICATION de polarité négative (Behrens, Tomei, and De Francesco, 1996). Cette enzyme à la

capacité de faire la synthèse d'ARN *de novo*, c'est-à-dire, que la polymérase virale est capable de se lier à l'extrémité 3' d'un ARN simple brin, puis à deux nucléotides dont l'accumulation constitue le début de la synthèse du brin complémentaire (Luo et al., 2000; Zhong et al., 2000). La détermination de la structure de la NS5B par cristallographie aux rayons X montre une structure en forme main droite ouverte, où des sous-domaines en N-terminal « doigts » et en C-terminal « pouce » encadrent un troisième sous-domaine « paume » (Ago et al., 1999; Lesburg et al., 1999). Cette disposition forme une profonde crevasse le long de laquelle vient se placer l'ARN viral simple brin. L'addition d'un nucléotide triphosphate pour allonger le brin amorce est alors catalysée par deux ions magnésium (Ferrari et al., 1999). La liaison de la matrice d'ARN, ainsi que l'initiation de la synthèse de l'ARN, sont régulées par une séquence en boucle flexible (*beta-hairpin*) située dans le sous-domaine du « pouce » (Hong et al., 2001). De plus, la synthèse de l'ARN viral peut être stimulée par une haute concentration en GTP via une faible affinité de liaison au site GTP dans la NS5B (Bressanelli et al., 2002). La polymérase du VHC constitue une des principales cibles des traitements antiviraux. La majorité des inhibiteurs des polymérases ciblent directement l'activité catalytique de l'enzyme et entraînent l'apparition rapide de mutations résistantes, limitant ainsi le traitement aux patients (Kuntzen et al., 2008).

2 Structure et composition des virions

Les caractéristiques biochimiques et morphologiques exactes du VHC infectieux n'ont toujours pas été élucidées de par son hétérogénéité ainsi qu'en raison du faible titre infectieux retrouvé dans les tissus ou en culture cellulaire. Jusqu'à aujourd'hui, la nature des glycoprotéines de l'enveloppe dans les virions est toujours inconnue et la communauté scientifique ignore si les particules du VHC possèdent une nucléocapside régulière ou plutôt une structure complexe ribonucléoprotéique. Toutefois, les premières études de microscopie électronique à transmission et de filtration ont montré que les particules du VHC provenant de sang de patients et de chimpanzés infectés sont de forme sphérique (icosédrique), mesurent entre 30-60 nm et sont étroitement liées à certaines composantes de la cellule hôte, particulièrement les lipoprotéines (Bosman et al., 1998; Ishida et al., 2001; Li et al., 1995; Petit et al., 2003).

Les protéines Core, E1 et E2 des virions sont les composantes majoritairement associées à la protéine chaperonne hsc70 dans les VHCcc en culture cellulaire et dans le sérum de patients infectés par le génotype 2a (Parent et al., 2009). L'apoprotéine E, un cofacteur de la cellule hôte, a aussi été retrouvée en association avec les particules virales du VHC (Chang et al., 2007). En fait, une récente étude a démontré par des méthodes de purification de haute affinité que l'ApoE est une composante intégrale de la particule virale (Merz et al., 2011). Chez les patients infectés, les particules virales circulent sous plusieurs formes et peuvent être associées aux lipoprotéines de faible densité (LDL) ainsi qu'aux lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Le virus retrouvé dans ces fractions est de nature plus infectieuse, mais il peut aussi circuler en association avec les immunoglobulines ou encore sous forme libre (Andre et al., 2005; Hijikata et al., 1993b). Cette variabilité explique en partie l'hétérogénéité inhabituelle et la faible densité des particules. Les particules du VHC chez les patients ont déjà été décrites comme étant des *lipo-viroparticules* sphériques (LVP) d'un diamètre de plus de 100 nm et de densité variant entre 1.25 et 1.06 g/ml (Nielsen et al., 2006). Des tests de neutralisation ont été effectués avec succès en utilisant des anticorps anti-apoB et apoE pour bloquer des infections faites avec des LVP. Inversement, une augmentation des récepteurs des LDL (LDLR) à la surface des cellules augmente l'internalisation du virus. Ces expériences

démontrent bien l'importance des LDLR et des lipoprotéines dans l'infection du VHC (Andre et al., 2002).

Dans le système de culture cellulaire des VHCcc, deux types de particules virales ont été observées par microscopie électronique: des particules de diamètre de 30-35 nm, correspondant aux nucléocapsides virales et des particules de diamètre de 50-60 nm, concordant aux virions infectieux. Ces particules hautement infectieuses ont une densité moyenne de 1.10 g/ml (Lindenbach et al., 2006). Les VHCcc sont semblables aux LVP, puisqu'ils sont hétérogènes et que les particules de faibles densités possèdent une haute infectiosité spécifique. De récentes études sur la composition lipidique des VHCcc infectieux démontrent qu'ils sont constitués d'une fraction de lipoprotéines VLDL et LDL ainsi que d'une grande proportion d'esters de cholestérol (Haid, Pietschmann, and Pecheur, 2009; Meunier et al., 2008; Podevin et al., 2010).

3 Entrée et récepteurs du VHC

Les étapes initiales du cycle de l'infection virale sont l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule cible. Ce processus complexe comprenant plusieurs étapes nécessite une interaction entre une ou des protéine(s) virale(s) et un ou des récepteur(s) cellulaire(s) spécifique(s) (Zeisel et al., 2011). Retrouvés en très grand nombres à la surface des hépatocytes, le LDLR a été proposé comme étant impliqué dans l'entrée initiale du VHC dans les cellules hépatiques (Agnello et al., 1999; Albecka et al., 2012). L'association des VLDL au VHC dans la circulation sanguine permet au virus de se lier aux cellules cibles par l'entremise des LDLR (Burlone and Budkowska, 2009). De plus, en infectant des hépatocytes primaires à l'aide de VHC isolé de patient, une corrélation a été démontrée entre l'accumulation d'ARN viral, l'expression d'ARN messager des LDLR et l'entrée de LDL (Molina et al., 2007b). Finalement, le potentiel impliquant le LDLR dans l'entrée du VHC a récemment été démontré avec le système des VHCcc (Hishiki et al., 2010). Le CD81, qui fait partie de la famille des téraspanines, est l'un des récepteurs les mieux caractérisés dans l'entrée du VHC. Le CD81 a été identifié en premier lieu comme étant une protéine soluble pouvant liée E2 et son rôle primordial dans l'entrée du VHC a par la suite été confirmé à maintes reprises (Pileri et al., 1998). La protéine CD81 est exprimée

sur de nombreux types cellulaires, incluant les hépatocytes. L'entrée du VHC est fortement réduite en présence d'anticorps anti-CD81, de CD81 soluble ou lorsque l'expression du CD81 est diminuée en culture cellulaire et *in vivo* dans la souris Scid/Alb-uPA (Meuleman et al., 2008; Molina et al., 2008). La voie de propagation du VHC de cellules à cellules *in vitro* peut être indépendante de CD81 (Timpe et al., 2008; Witteveldt et al., 2009). Le site de liaison de la glycoprotéine de surface E2 sur CD81 a été cartographié et est situé dans une grande boucle extracellulaire composée de 89 acides aminés. Fait intéressant, un produit tronqué de la partie N-terminale (EWI-2wint), identifié antérieurement comme partenaire de CD81, peut bloquer l'interaction E2-CD81 et inhiber l'entrée du virus. De plus, il a été observé qu'EWI-2wint est absent des lignées cellulaires permissives et cette découverte laisse entrevoir un inhibiteur potentiel « naturel » au niveau du tropisme du VHC (Rocha-Perugini et al., 2008; Stipp, Kolesnikova, and Hemler, 2001).

Le récepteur scavenger de classe B, type 1 (SR-BI) est un second récepteur découvert comme servant de médiateur lors de l'entrée du VHC dans les cellules (Scarselli et al., 2002). SR-BI est impliqué dans la captation des esters de cholestérol provenant des HDL et il peut également lier d'autres ligands, dont certains affectent l'infectiosité du VHC (Connelly and Williams, 2004; von Hahn et al., 2006). L'ajout de HDL plasmatiques purifiés augmente l'entrée des VHCpp *in vitro* et qu'une diminution de l'expression de SR-BI par l'utilisation d'ARN d'interférence (ARNi) réduit l'entrée des VHCpp. L'augmentation de l'entrée des VHCpp dans les cellules dépendrait donc de la liaison entre les HDL et le SR-BI (Bartosch et al., 2005; Voisset et al., 2005). Toutefois, la co-expression des récepteurs CD81 et SR-BI à elle seule est insuffisante à l'entrée du VHC dans différents modèles cellulaires (Bartosch et al., 2003).

Une protéine des jonctions serrées hautement exprimée dans les cellules hépatiques, la claudine-1 (CLDN-1), a par la suite été identifiée comme co-récepteur essentiel à l'entrée du virus. Cette fonction est partagée par deux autres membres de la famille des CLDN, CLDN-6 et CLDN-9 (Evans et al., 2007; Ploss et al., 2009). De plus, deux facteurs supplémentaires, les glycosaminoglycans (GAG) et le LDLR, semblent jouer un rôle important dans l'attachement des particules virales aux cellules cibles

(Agnello et al., 1999; Lozach et al., 2003; Molina et al., 2007b). Récemment, l'occludine (OCLN), une autre protéine des jonctions serrées, a été identifiée comme un facteur essentiel à l'entrée du VHC dans les cellules (Ploss et al., 2009). Une équipe de recherche américaine a démontré que, en plus de l'expression de CD81, SR-BI et CLDN-1, c'est l'expression de l'OCLN qui rend permissive l'entrée du VHC dans les lignées cellulaires hépatocytaires humaine. Par opposition, une diminution d'expression d'OCLN par ARNi inhibe l'entrée des VHCcc dans les cellules transfectées (Ploss et al., 2009). De plus, il a été démontré qu'OCLN interagit directement avec E2 (Benedicto et al., 2008). Parmi tous les facteurs d'entrée identifiés jusqu'à présent, les formes humaines des récepteurs CD81 et OCLN semblent responsables de la spécificité d'espèce dans l'entrée des virions (Ploss et al., 2009).

Peu d'éléments sont connus sur comment les facteurs identifiés précédemment se coordonnent et s'orchestrent pour faciliter l'entrée du VHC dans les cellules. Un modèle d'entrée du virus a été proposé et il implique un processus en plusieurs étapes (Figure 8) : premièrement, l'attachement et la liaison du VHC avec les récepteurs, suivi de la liaison avec les protéines des jonctions serrées, de l'internalisation par endocytose, laquelle est pH dépendante et résulte de la fusion avec la membrane cellulaire et finalement, la relargage de l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule hôte.

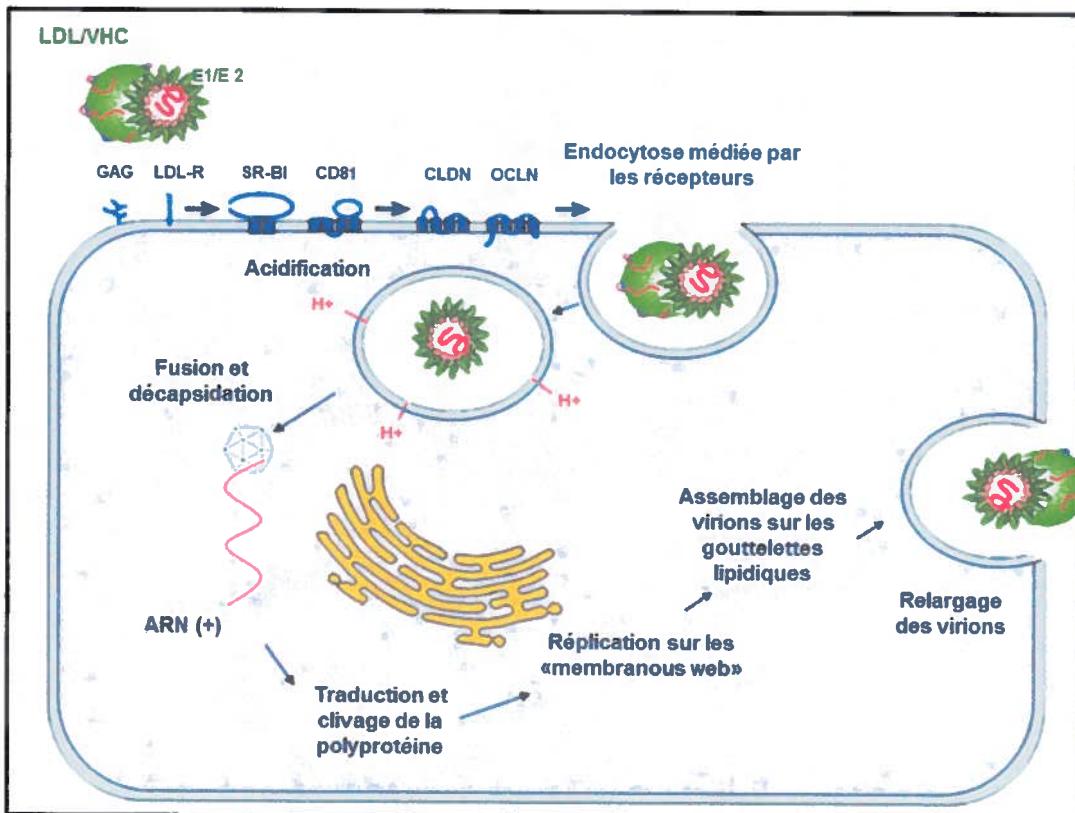


Figure 8 Modèle d'entrée et cycle de réplication du VHC dans l'hépatocyte
Adapté de Tang H. et al. 2009.

3.1 La proprotéine convertase PCSK9 et CD81

La proprotéine convertase subtilisine/Kexin type 9 (PCSK9) a été identifiée dans le troisième locus dans la région du chromosome 1p32 dans l'hypercholestérolémie familiale autosomique dominante (Hunt et al., 2000). Cette protéine est exprimée principalement dans le foie, dans l'épithélium intestinal, le rein et les neurones. PCSK9 serait impliquée dans la différenciation neuronale et pendant la régénération hépatique (Seidah et al., 2003). La principale fonction de PCSK9 est de réduire le niveau d'expression protéique de LDLR dans les hépatocytes (Maxwell and Breslow, 2004; Rashid et al., 2005). Il existe des mutations de gain de fonction du gène PCSK9 qui causent l'hypercholestérolémie chez l'humain. À l'inverse, une perte de fonction de PCSK9 a pour effet de réduire le cholestérol LDL sanguin et ainsi diminuer les risques de maladie cardiovasculaire coronarienne (Figure 10) (Abifadel et al., 2003).



Figure 9 Effet du niveau d'activité de PCSK9 sur les taux de cholestérol plasmatique

La protéine PCSK9 fait partie de la famille des sérine protéases et de la sous-famille des protéinases K. Cette protéine est synthétisée sous forme de pro-protéine qui, ensuite, par autocatalyse, va se cliver pour produire une protéine mature (Figure 9). La protéine PCSK9 est sécrétée sous forme d'un complexe comprenant la partie clivée du prodomaine en N-terminal associé avec le domaine catalytique. L'activité catalytique de PCSK9 est essentielle à sa maturation et à sa sécrétion, mais ne semble pas nécessaire à la réduction des LDLR à la surface des cellules lorsque sécrétée (Benjannet et al., 2004; McNutt, Lagace, and Horton, 2007).

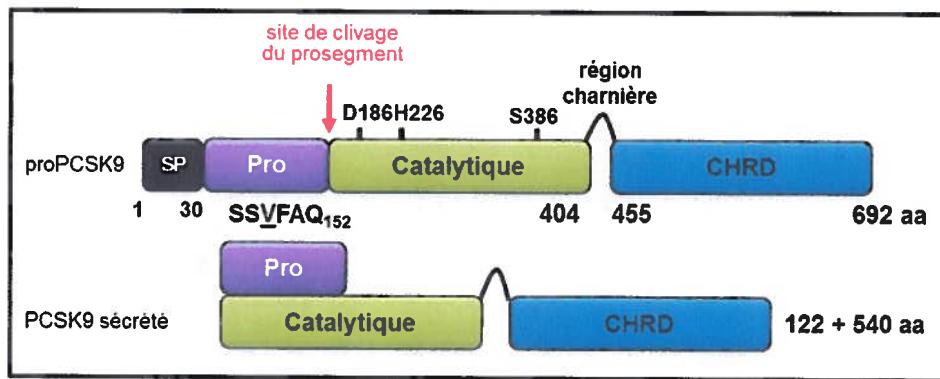


Figure 10 Représentation schématique des domaines de PCSK9

Le peptide signal (SP) dirige PCSK9 dans le réticulum endoplasmique, le prosegment (Pro) est essentiel au repliement et à la sortie de PCSK9 du réticulum endoplasmique, la région catalytique, qui contient les résidus D186, H226 et S386, est essentielle à l'activité catalytique et à l'interaction avec le LDLR et le domaine CHRD est essentiel à l'endocytose de PCSK9 et à la dégradation du LDLR.

Il a été montré que le cholestérol via les voies de SREBP régule l'expression du gène PCSK9 (McNutt, Lagace, and Horton, 2007). Une diminution de l'expression du gène PCSK9 a été observé chez des souris alimentées avec une nourriture riche en cholestérol. De plus, une augmentation importante de l'expression hépatique de PCSK9 a été montrée chez des souris où SREBP1a et SREBP2 étaient inhibés; ces deux facteurs de

transcription sont activés lorsque la cellule est déplétée en cholestérol (Horton et al., 2003). Il a été démontré que les statines, des inhibiteurs de l’HMG-CoA réductase, induisent l’expression de PCSK9 (Rashid et al., 2005). Les statines utilisées en clinique servent à réduire le taux de cholestérol dans le sang en diminuant la production de cholestérol par le foie et en modifiant la façon dont le sang et les tissus utilisent le cholestérol. La surexpression de PCSK9 chez la souris (ex. adénovirus recombinants) induit une augmentation de la concentration de cholestérol circulant, en augmentant principalement le cholestérol LDL. Ce phénomène est associé à une diminution de l’expression du LDLR hépatique (Maxwell and Breslow, 2004). Toutefois, chez des souris dont le gène codant pour les LDLR a été inhibé, la surexpression de PCSK9 n’a pas d’effet sur les lipides sanguins. Ces résultats montrent que PCSK9 inhibe l’expression des LDLR, ce qui induit une augmentation des concentrations du cholestérol LDL circulant (Maxwell and Breslow, 2004). Chez la souris, la suppression du gène PCSK9 augmente le nombre de LDLR hépatique sans augmenter les niveaux d’ARN messager et diminuer les taux de cholestérol total plasmatique, principalement les HDL. Dans la même étude, la déficience en PCSK9 augmente la clairance des LDL et augmente la réponse aux traitements par les statines (Rashid et al., 2005).

De nombreuses études ont démontré l’implication des LDLR dans l’entrée du VHC. Récemment, notre laboratoire a démontré que PCSK9 module le niveau d’expression de CD81, un récepteur majeur du VHC (Labonte et al., 2009). En effet, l’expression stable de PCSK9 dans des cellules Huh7 diminue la présence du CD81 et du LDLR à la surface des cellules. Dans cette étude, dont je suis coauteur, nous avons montré que la présence de PCSK9 a un effet antiviral et réduit l’infectiosité du VHC JFH1 *in vitro*. De plus, l’incubation des cellules Huh7 avec des doses croissantes de PCSK9 soluble montre que PCSK9 est capable de bloquer l’infection au VHC de manière dose-dépendante. De plus, l’expression de CD81 à la surface des cellules semble être régulée par PCSK9 de manière indépendante des LDLR. Finalement, dans des expériences *in vivo*, l’augmentation des niveaux du CD81 a été observé dans les hépatocytes de souris déficientes en PCSK9 (PCSK9^{-/-}) et ce, indépendamment de la présence du LDLR (LDLR^{-/-}). En conclusion, ces résultats suggèrent que les niveaux

plasmatiques et/ou l'activité de PCSK9 puissent réguler l'infectiosité du VHC chez les humains (Labonte et al., 2009) (article en appendice A).

4 Le complexe de réPLICATION du VHC

Comme le VHC, tous les virus à ARN de polarité positive induisent des altérations membranaires significatives dans les cellules infectées où se situe le site de réPLICATION. La réPLICATION du VHC va induire dans la cellule la formation et le réarrangement de vésicules périnucléaires denses appelées « *membranous web* » (MW). Le MW a été observé dans des cellules exprimant la polyprotéine du VHC en absence de réPLICATION, suggérant que la formation du MW ne nécessite pas la réPLICATION de l'ARN mais seulement la présence de protéines virales (Egger et al., 2002). Il a été démontré que la protéine NS4B seule avait la capacité d'induire les MW tout comme les cellules Huh7 contenant un réPLICON, suggérant qu' NS4B est la protéine majeure et peut-être la seule protéine virale à être impliquée dans la formation de MW (Gosert et al., 2003). La région carboxy-terminale de NS4B semble être importante dans la création de MW (Aligo et al., 2009).

Suite à la purification partielle d'extrait membranaire contenant le MW, la RdRp dans ce complexe semblaient être protégée lors de digestion à la nucléase et la protéase (Quinkert, Bartenschlager, and Lohmann, 2005; Yang et al., 2004). Par analogie avec d'autre virus à ARN de polarité positive, la protection observée de la réPLICASE par le MW serait due à la localisation de la réPLICATION à l'intérieur d'invaginations membranaires partiellement refermées qui représenteraient les petites vésicules sphériques composant le MW. Présentement, les modèles suggèrent que la machinerie virale réPLICATIVE se situe à la surface intérieure de ces vésicules et est seulement accessible par le cytoplasme via un pore qui est en contact avec la portion tubulaire du MW et/ou du RE. Dans des cellules infectées par VHC, des analyses de microscopie confocale ont montré le complexe de réseaux de vésicules et de tubules du MW à proximité et/ou en contact avec les LD et le RE (Targett-Adams, Boulant, and McLauchlan, 2008).

L'origine cellulaire du MW reste encore inconnue jusqu'à aujourd'hui. Cependant plusieurs études suggèrent qu'il dérive de membranes modifiées du RE rugueux. La

création de MW et le réarrangement massif des membranes dans la cellule par le VHC va requérir l'utilisation de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, le transport des lipides et le trafic des vésicules. Le VHC va induire l'expression de certains gènes du métabolisme des lipidiques comme l'ATP citrate lyase et l'acetylcoenzyme A synthase (Kapadia and Chisari, 2005; Su et al., 2002). Les inhibiteurs de la synthèse des lipides sont de puissants inhibiteurs de la réPLICATION du VHC. De plus, la protéine NS4B semble réguler l'activité de SREBP « *sterol regulator element binding protein* », un régulateur du métabolisme des lipides, qui pourrait modifier la production de lipide dans la cellule et ainsi favoriser la formation des structures des MW (Park et al., 2009). En culture cellulaire, la réPLICATION de l'ARN du VHC est stimulée par l'ajout d'acide gras saturés et mono-insaturés. Cependant elle est inhibée par les acides gras polyinsaturés (Kapadia and Chisari, 2005). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la formation et la fonction du complexe de réPLICATION sont influencées de manière importante par les lipides en favorisant la fluidité des membranes du MW. Par exemple, le cholestérol est un constituant important dans l'activité de la réPLICASE comme dans la fluidité des membranes du MW. Finalement, il a été montré que la géranylgerylation d'une ou plusieurs protéines cellulaires (FBL-2) était nécessaire à la réPLICATION du virus (Ye et al., 2003).

Récemment, des études de criblage génomique entreprises par de nombreux laboratoires de recherche ont identifié un facteur cellulaire appelé phosphatidylinositol kinase-4 (PI4K) essentiel à la réPLICATION du VHC (Berger et al., 2009; Borawski et al., 2009; Vaillancourt et al., 2009). Les résultats tendent à démontrer que le MW est composé de phosphatidylinositol kinase-4,-5 biphosphate le produit enzymatique du PI4K. Les phosphatidylinositols et le PI4K vont être relocalisés dans le cytoplasme des cellules infectées par le VHC. La signification de tous ces résultats n'est pas très claire cependant il est certain que les phosphatidylinositols sont essentiels à la formation du MW et/ou sont des composantes lipidiques importantes dans la structure du MW. De plus, des résultats ont montré que Rab5 et Rab7, des protéines de transport vésiculaire, étaient impliquées dans la formation du MW (Manna et al., 2010; Stone et al., 2007).

4.1 RéPLICATION VIRALE ET AUTOPHAGIE

L'autophagie est un processus du catabolisme cellulaire dont le rôle premier est de maintenir l'homéostasie en dégradant et recyclant continuellement des composants cytoplasmiques. L'autophagie sert à recycler les acides aminés pour maintenir en activité les mécanismes essentiels à la survie cellulaire et à éliminer les organites endommagés ou les agrégats de protéines mal formées (Kroemer and Levine, 2008). Elle se met en place notamment en cas de carence nutritionnelle et permet la génération d'énergie et de nutriments indispensables à la survie cellulaire. Elle repose sur la formation de vacuoles, nommées autophagosomes, à partir d'endomembranes vraisemblablement issues du RE ou d'une membrane préexistante appelée phagophore (Reggiori, 2006). Les gènes ATG « *autophagy-related* » ont été découverts en premier lieu chez la levure, puis leurs homologues chez les mammifères (Klionsky et al., 2003; Longatti and Tooze, 2009). Plusieurs protéines autophagiennes sont impliquées dans la formation de l'autophagosome qui s'effectue en trois étapes majeures : l'initiation, l'elongation et la maturation (Figure 11 A). La première étape est l'initiation de la formation d'un complexe sérine-thréonine kinase agissant en aval de la protéine kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) : Atg1, Atg13 et Atg17. Il y a aussi formation d'un complexe permettant la formation de l'autophagosome : becline -1 / PI3K type III, Atg14, Vps34, Vps150 (He and Levine, 2010). La deuxième étape, « l'elongation », fait intervenir deux systèmes de conjugaison. Le premier système de conjugaison est le complexe ATG12 formé des protéines Atg16, 5 et 12. Dans le deuxième système, il y a conjugaison du phophatidyléthanolamine (PE) à LC3 par l'action séquentielle de plusieurs protéines : Atg4, Atg7 et Atg3. Cette conjugaison lipidique mène à la conversion de la forme soluble de LC3-I à la forme LC3-II associée aux vésicules autophagiennes, permettant ainsi la fermeture des vacuoles autophagiennes. Dans la troisième étape, il y a fusion de l'autophagosome avec les lysosomes permettant ainsi la dégradation de l'organite ou du pathogène (Rautou et al., 2010) (Figure 11 B).

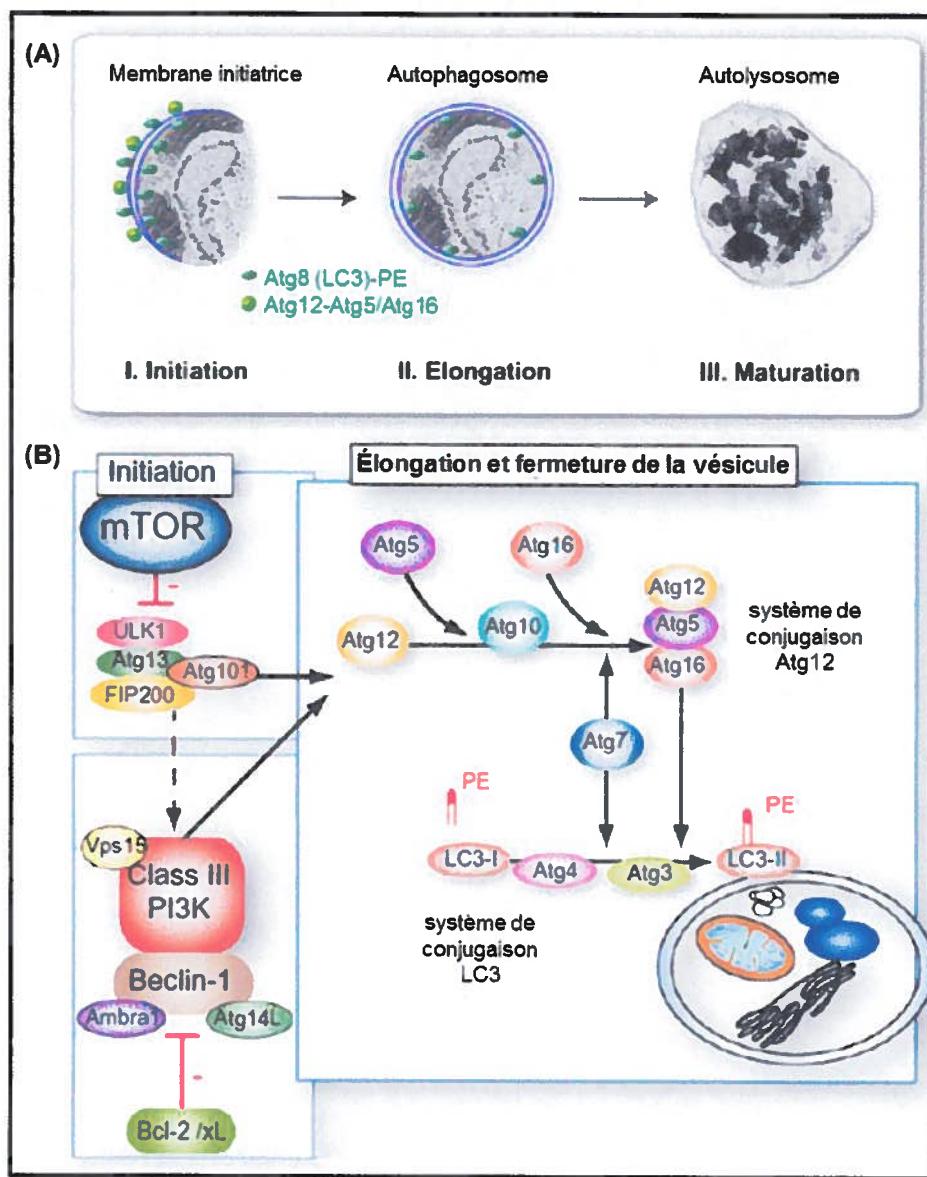


Figure 11 Machinerie moléculaire de la formation de l'autophagosome

(A) Les 3 étapes de l'autophagie, adapté de Deretic V. et al. 2009. (B) La régulation de la machinerie moléculaire de l'autophagie adapté de Rautou P.-E. et al. 2010.

L'autophagie offre également à chaque cellule un moyen de défense contre des pathogènes présents dans le cytoplasme. Aussi, la co-évolution des cellules hôtes et des pathogènes a sélectionné de nombreux micro-organismes capables d'échapper à l'autophagie, voire de détourner ce mécanisme pour leur propre compte, comme par exemple le VHB, le VHC et d'autre, virus (Deretic and Levine, 2009).

À l'intérieur de la cellule, il a été proposé que l'autophagie puisse servir d'usine de fabrication de membranes intracellulaires associées à la réPLICATION des virus à ARN, connus pour se répliquer et s'assembler dans le cytoplasme. L'expression de la protéine non-structurale 2BC du virus de la poliomyélite en culture cellulaire est connue pour induire la lipidation de la protéine LC3 et la formation de membrane simple vésiculaire, toutefois la co-expression des protéines 2BC et 3A du même virus vont induire la formation de vésicules à double membrane (DMV) (Taylor et al., 2009; Taylor and Kirkegaard, 2007). D'autres études démontrent que les complexes de réPLICATION/transcription de l'ARN viral des nidoviruses, comme le virus de l'artérite équine et le coronavirus (SARS-CoV), sont ancrés sur des DMV qui, en raison de leur taille leur deux couches membraneuses, ressemblent à des autophagosomes (de Haan and Reggiori, 2008).

Dans des études d'infection avec les coronavirus comme le virus de l'hépatite murine (MHV) ou le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS)-CoV, il a été démontré que les DMV contenaient des éléments viraux et qu'elles étaient associées à la protéine autophagique LC3 (de Haan and Reggiori, 2008). De même, dans les cellules infectées par le rotavirus, NSP4, une protéine virale impliquée dans la réPLICATION du virus et dans le bourgeonnement des doubles couches des particules immatures dans le lumen du RE, co-localise avec LC3 et NSP5, un marqueur de site de réPLICATION de l'ARN des rotavirus (Berkova et al., 2006). En résumé, ces résultats suggèrent que la voie de l'autophagie est importante pour les rotavirus et la réPLICATION des nidovirus.

L'infection par le virus de la dengue (DENV), un virus à ARN simple brin de polarité positive de la famille *Flaviviridae*, stimule la formation des autolysosomes, suggérant que la machinerie autophagique de la cellule favoriserait la réPLICATION du DENV (Lee et al., 2008b). Dans les cellules infectées par le DENV, il a été démontré que la protéine LC3 colocalisait avec l'ARN double brin et la protéine non structurale NS1, suggérant la présence de complexes de réPLICATION dans les vésicules autophagiques. Panyasrivanit et al. ont proposé que les vésicules autophagiques induits par le DENV seraient en partie des amphisomes, c'est à dire, des compartiments cellulaires créés par la fusion entre les endosomes et les autophagosomes (Panyasrivanit et al., 2009).

Le lien entre l'autophagie et la réPLICATION du VHC est supporté par plusieurs études (*in vitro* et *in vivo*). L'inhibition de certaines protéines autophagiQues : beclin-1, ATG4B, ATG5 et ATG12 a supprimer la réPLICATION du VHC au début de l'infection (Dreux et al., 2009). Spécifiquement, l'inhibition du gène ATG7 va diminuer la production de particules virales infectieuses sans toutefois affecter l'expression des protéines virales (Tanida et al., 2009). En induisant un stress au RE, le VHC, indépendamment du génotype, va induire la production d'autophagosomes dans la cellule (*in vitro* et *in vivo*) (Ait-Goughoulte et al., 2008; Dreux et al., 2009). Récemment, Osana et al. ont démontré que la formation d'autophagosomes et la lipidation de la protéine LC3 étaient augmentées lorsque des cellules Huh7 infectées par le VHC JFH1 étaient traitées à l'éthanol (Osna, Thomes, and Jr, 2011). Néanmoins, aucune co-localisation avec la protéine LC3 II et les protéines virales du VHC n'a été observée jusqu'à aujourd'hui (Dreux et al., 2009; Tanida et al., 2009).

Dans l'infection par le VHC, l'induction de la formation d'autophagosomes n'active pas nécessairement la dégradation des protéines autophagiQues parce qu'il a été démontré que le VHC induit une réponse autophagique incomplète en incapacitant la fonction des autolysosomes. Une des raisons possibles pour expliquer ce phénomène, c'est qu'il y est un défaut au niveau de la fusion des autophagosomes-lysosomes ou une détérioration de la dégradation du contenu protéolytique post-fusion des autophagosomes induit par l'alcalinisations du lysosome dû à la protéine p7 du VHC (Wozniak et al., 2010). Donc, la réduction de la capacité de digestion des lysosomes pourrait prolonger la suivie du VHC dans la cellule. En conclusion, ces résultats démontrent que les protéines autophagiQues semblent agir comme co-facteurs provirals en favorisant la réPLICATION du VHC, mais le mécanisme impliqué est encore inconnu.

5 Assemblage et relargage des virions

Les nouveaux systèmes de production de particules virales du VHC *in vitro* permettent aujourd'hui de mieux caractériser la voie d'assemblage et de relargage des virions. Avant la découverte de ces systèmes, une accumulation de la protéine core avait été observée à proximité des LDs « gouttelettes lipidiques » dans des lignées de cellules

exprimant core. Avec le système robuste de production des VHCcc, l'association de core avec les cLDs « gouttelettes lipidiques cytosolique » a été démontrée et est essentiel à l'assemblage des virions. De nombreuses études indépendantes sont en accord avec cette conclusion : 1) l'inhibition du clivage de core par la signal peptide peptidase inhibe la mobilisation de core sur les cLDs et bloque la production de particules virales (Targett-Adams et al., 2008). 2) Des mutations dans la région D2 de core perturbant l'interaction avec les cLDs bloquent la production de particules virales (Boulant, Targett-Adams, and McLauchlan, 2007; Miyanari et al., 2007b). 3) Les protéines non structurales, spécialement la NS5A, sont recrutées aux cLDs et colocalisent avec la protéine core. 4) Des mutations dans la NS5A ayant pour effet de perturber la localisation avec les cLDs ou la colocalisation avec NS5A-core bloquent la production de virus (Appel et al., 2008). Ces données nous apportent de nombreuses preuves du rôle important des cLDs dans l'assemblage du VHC.

Un des modèles qui est présentement proposé, est le transfert de la protéine core à la surface des cLDs. La protéine core est ensuite recrutée de nouveau sur les membranes du RE au site d'assemblage où core va interagir avec la répliqueuse ou avec la NS5A. Dans ce modèle, les cLDs vont servir de véhicule pour transporter la protéine core en la transférant au site de traduction et de réPLICATION puis au site d'assemblage (Welte, 2009). Dans un autre modèle, la formation de la nucléocapside va être initiée à la surface des cLDs. La distribution de l'ARN virale à la protéine core se fait via NS5A qui est aussi localisée à la surface des cLDs (Hinson and Cresswell, 2009; Penin et al., 2004).

De nombreux facteurs de la cellule hôtes ont été décrits comme participant dans l'assemblage du VHC : apoE, apoB, MTP « *microsomal triglycéride transport protein* », hsc70 « *heat shock cognate protein 70* », annexine A2 et DGAT1 « *diacylglycerol acyltransferase-1* » (Backes et al., 2010; Herker et al., 2010; Parent et al., 2009). Plusieurs études ont démontré que la maturation et le relargage des virions, qui est l'étape tardive de l'assemblage, sont étroitement liées à la voie de sécrétion des VLDL (Huang et al., 2007; Jiang and Luo, 2009). Ainsi, l'enveloppement et la maturation du VHC pourrait avoir lieu à la membrane du RE dans un micro domaine spécialisé riche en lipide, enrichie de LDs et supportant la synthèse des LDs luminales (luLDs), défini comme

les précurseurs des VLDL. La viroprotéine p7 et la portion amino-terminale de la protéase NS2 sont essentielles à la production de virions infectieux et l'ajout de mutations dans ces protéines bloquent les étapes tardives de maturation et la relargage du virus (Jirasko et al., 2010; Wozniak et al., 2010). Malheureusement, le rôle précis de ces protéines dans l'assemblage demeure à être défini.

6 Défenses antivirales de la cellule

Le système immunitaire de l'hôte possède deux principales lignes de défenses : l'immunité innée et l'immunité adaptative. La réponse immunitaire innée est rapide mais non-spécifique. Elle inclut des cellules médiatrices et des composantes humorales, tels les facteurs du complément et l'interféron de type I (IFN- α , β). Les cellules immunitaire et autres cellules participant à cette défense de l'hôte comme les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les cellules NK (*natural killer*) et les cellules NKT (*natural killer T*) sont équipées de récepteurs de motifs pathogéniques. Suivant l'infection par le VHC, ces cellules détectent un motif moléculaire associé au virus et elles sont activées et recrutées au foie où une série d'évènements antiviraux intracellulaires se mettent en œuvre dans les cellules infectées et avoisinantes (Sen, 2001; Steinman and Hemmi, 2006).

L'état antiviral de la cellule est principalement dépendant de l'induction de l'interféron de type I (IFN- α , β). L'activation de ce système est médié par les récepteurs TLRs (*toll-like receptors*), qui sont activés suite à la reconnaissance de motifs moléculaires communs présents chez les microorganismes pathogènes dénommés PAMPs « *pathogen-associated molecular patterns* ».

Il existe deux voies menant à la réponse interféron (Figure 12 A). La première est médiée par RIG-I/MDA5 et l'autre est activée par MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) (Li et al., 2005a; Yoneyama et al., 2004). RIG-I et MDA-5 reconnaissent respectivement l'ARN simple brin triphosphate du VHC et les ARN doubles brins par leur domaine CARD. Après activation, RIG-I et MDA-5 lient IPS-1 (aussi connue sous les noms Cardif, VISA, MAVS) à la surface des mitochondries et transmettent un signal d'activation aux complexes IKK ϵ et TBK-1 (TANK-binding

kinase-1) (Fitzgerald et al., 2003). Ces deux kinases phosphorylent ensuite IRF-3 (*interferon regulator factor-3*) qui active le promoteur de l'interféron- β (Seth et al., 2005). Les ARN double brin du VHC sont aussi reconnus par les TLR-3, qui activent IKK ϵ /TBK-1 via TRIF (*TIR-dimain-containing adaptater-inducing interferon- β*) se joignant à la voie RIG-I/MDA5.

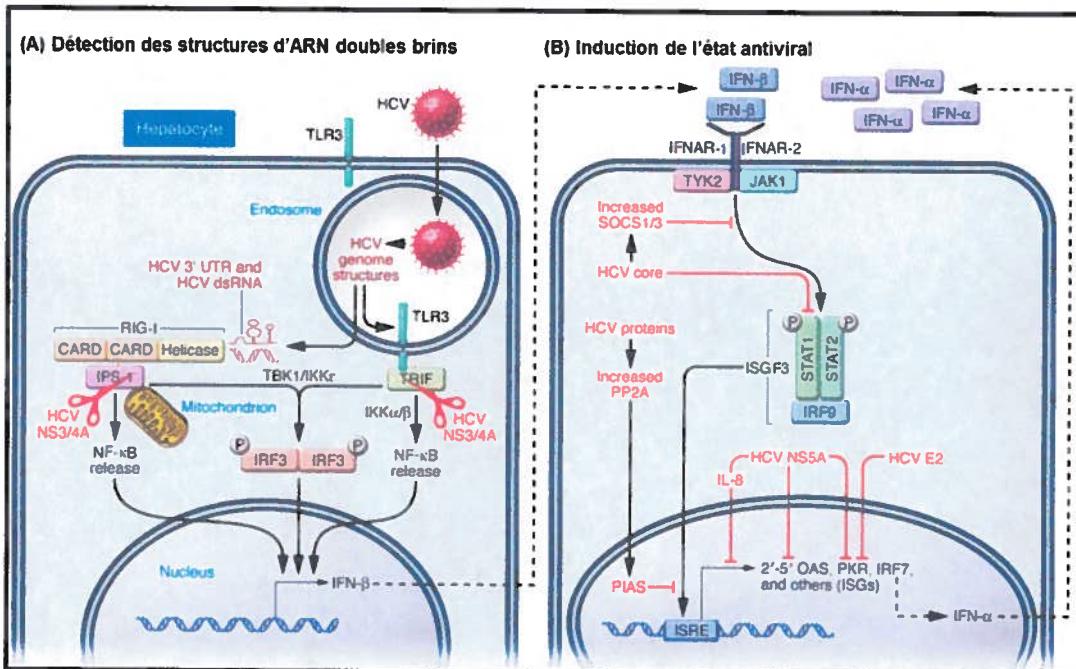


Figure 12 Réponse immunitaire innée à l'infection au VHC et mécanismes d'évasion utilisés par le VHC
Adapté de Rehermann B. 2009.

Dans la deuxième voie de signalisation, TLR-7 reconnaît les ARN simple brin du VHC, et via la protéine adaptatrice MyD88 active IRAK4/IRAK1 (Abe et al., 2007). Ces deux kinases stimulent la synthèse de l'interféron- α via le facteur de transcription IRF7. La protéine adaptatrice MyD88 est universelle et elle est utilisée par les autres TLR (excepté TLR3) pour activer le facteur de transcription NF-κB. Cette cascade d'activation mène à l'expression d'IFN- α/β , de cytokines, de chimiokines et aide au recrutement des leucocytes (Szabo and Dolganiuc, 2005). L'IFN- α/β sécrété se lie aux récepteurs de l'interféron et stimule la voie de signalisation JAK-STAT, conduisant à l'induction de l'expression de plus de 300 gènes (Pflugheber et al., 2002). Il existe plusieurs protéines induites par l'interféron ayant des propriétés antivirales contre le VHC : la protéine

kinase R (PKR), l'ADAR 1 (adénosine déaminase spécifique à l'ARN), le système 2'-5' Oligo Adénylate Synthétase/RNaseL et p56 (Guo et al., 2004; Taylor et al., 2005; Wang et al., 2003).

6.1 Mécanismes d'évasion du VHC

Le VHC utilise différentes stratégies pour déjouer l'activité antivirale médiée par l'interféron (Thimme, Lohmann, and Weber, 2006). La protéase NS3/4 du VHC a la capacité de cliver et d'inactiver spécifiquement IPS-1 et TRIF (Li et al., 2005b; Meylan et al., 2005). Aussi, NS3 interagit directement avec TBK-1 pour prévenir l'activation d'IRF-3 (Otsuka et al., 2005). La protéine core du VHC va interférer au niveau de la voie de signalisation JAK/STAT en activant SOCS-3, un inhibiteur spécifique de cette voie (Bode et al., 2003). Finalement, la protéine NS5A inhibe l'activité antivirale de l'interféron en augmentant la sécrétion d'IL-8 et elle interfère aussi dans la voie du système 2'-5' Oligo Adénylate Synthétase/RNaseL en liant la 2-5 OAS (Taguchi et al., 2004; Wagoner et al., 2007) (Figure 12).

7 Approches thérapeutiques actuelles et futures du VHC

Le traitement disponible à l'heure actuelle contre le VHC est l'administration d'INF- α pégylé (PEG-INF- α) en combinaison avec la ribavirine pour une durée de 48 semaines (Fried et al., 2002; Manns et al., 2001). L'élimination de l'infection virale suite à ce traitement est de 55% (Figure 13). Les gens infectés par le génotype 1 du VHC ont un taux d'élimination du virus variant plutôt entre 40-50%, dépendant de la dose de ribavirine administrée, alors que les personnes infectées par les autres génotypes ont un taux de guérison de 75% (Hadziyannis et al., 2004). Malheureusement, cette thérapie comporte de nombreux effets secondaires chez le patient : symptômes grippaux, fatigue, fièvre, nausées, anémie et thrombocytopénie. Récemment, une équipe de recherche a découvert un polymorphisme à proximité du gène IL28B (INF- λ -3) sur le chromosome 19. Ce polymorphisme génétique serait un facteur de pronostic majeur de la réponse au traitement INF/ribavirine et de l'élimination naturelle des virus (Balagopal, Thomas, and Thio, 2010; Thomas et al., 2009).

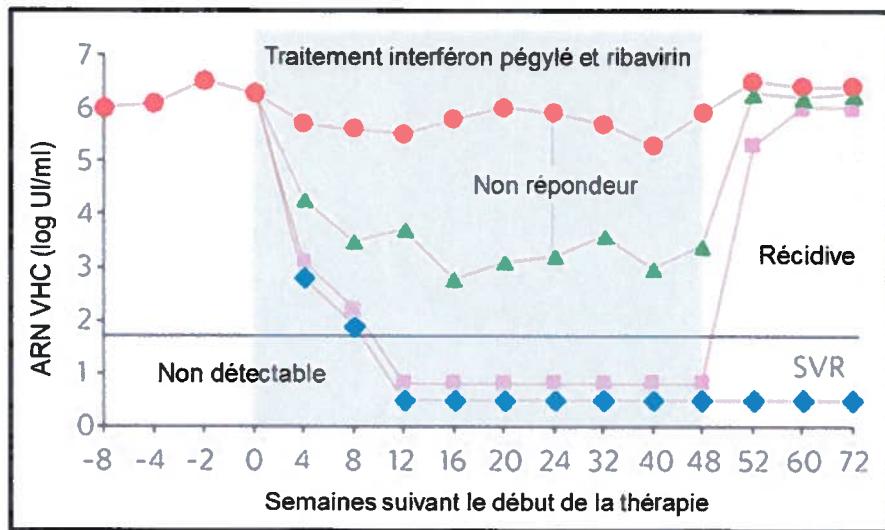


Figure 13 Réponses virologiques au traitement PEG-IFN α et ribavirine chez les patients infectés par le VHC

Il existe 3 types de réponses à la thérapie antivirale. La première est une réponse virologique soutenue (SVR), où la présence d'ARN virale est indétectable durant et suite à l'arrêt du traitement). La seconde consiste en une récidive suite à l'arrêt du traitement alors que dans la troisième, le patient ne répond pas au traitement. UI : unité internationale. *Adapté de Feld J.J. et al. 2005.*

Jusqu'à aujourd'hui, aucun vaccin prophylactique ou thérapeutique déterminant n'a été développé. Pour la première fois, des études cliniques en phase III ont été réalisées sur la première génération d'inhibiteurs des protéines non structurales du VHC : les inhibiteurs de protéases de la NS3/4 (VHC PI). Après une décennie ou la seule option de traitement était le PEG-INF- α /ribavirine, la triple thérapie, incluant un VHC PI, sera bientôt le nouveau standard. En premier lieu, McHutchison *et al.* ont rapporté l'efficacité et l'innocuité du telaprevir en combinaison avec le PEG-INF- α /ribavirine chez 465 patients VHC $^+$ non répondeurs au traitement standard (McHutchison et al., 2010). Dans cette étude, l'ajout du telaprevir au traitement standard augmente de façon notable, jusqu'à 53% comparativement à 14% dans le groupe témoin, la réponse virale soutenue (SVR) chez ces patients normalement difficiles à traiter.

Dans une deuxième publication d'étude clinique en phase II, Kwo *et al.* ont rapporté des résultats de traitement avec un autre VHC PI, le boceprevir. L'ajout de cette molécule au traitement standard augmente manifestement la SVR (78% versus 38%) chez les patients VHC $^+$ de génotype 1 sans traitement antérieur (Kwo et al., 2010). Toutes ses études confirment que la combinaison de ces trois médicaments (PEG-INF- α /ribavirine +

VHC PI) est nécessaire pour augmenter de façon considérable la SVR. L'efficacité et l'innocuité de ces deux molécules (telaprevir et boceprevir) ont été démontrées récemment dans de grandes études cliniques de phase III (ADVANCE, REALISE et SPRINT-2). Elles viennent récemment d'être approuvées par la FDA (Bacon et al., 2011; Jacobson et al., 2011).

Malgré les progrès remarquables faits dans le traitement contre le VHC avec l'ajout de VHC PI, il demeure que le PEG-IFN- α /ribavirine comporte beaucoup d'effets secondaires pour les patients. Ainsi, le développement d'un traitement pour atteindre une SVR sans l'utilisation d'IFN serait l'ultime traitement dans la lutte contre le VHC. Dernièrement, INFORM-1, une étude clinique sans régime d'IFN a été lancée. Une cohorte de 88 patients VHC⁺ de génotype 1 a été traitée en combinaison avec deux antiviraux directement actifs (direct-acting antiviral DAA) : un VHC PI, le danoprevir et un inhibiteur nucléosidique de la polymérase NS5B, le RG7128. L'administration orale d'une combinaison de ces deux médicaments à la plus haute dose mène à une réduction de 5.1 log(10) des ARN du VHC au niveau du sérum des patients en seulement 14 jours. De plus, aucune résurgence virale n'a été observée après 4 semaines de traitement (Gane et al., 2010).

Une autre étude clinique en phase I a mis en évidence le haut potentiel d'un inhibiteur de la protéine NS5A chez des patients infectés par le VHC. Dans cette étude réalisée chez des patients infectés chroniquement avec le génotype 1, l'administration d'une simple dose de 100 mg de BMS-790052 a diminué le titre viral de 3.3 log en moyenne 24 heures suivant le traitement. Cette réduction est maintenue durant au moins 120 heures. Des études biochimiques suggèrent que ce composé se lierait directement à la protéine NS5A du virus. En culture cellulaire, la concentration requise pour bloquer la réPLICATION du VHC serait de quelques molécules par cellule (Gao et al., 2010).

À la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, Lanford *et al.* ont développé un antagoniste du microARN-122. Ce microARN est très abondant dans le foie humain et il est un cofacteur essentiel à la réPLICATION du VHC en se liant dans la région 5'NCR du génome viral. Cette équipe de recherche a montré que l'utilisation d'oligonucléotides phosphorothioates modifiés (le SPC3649) pouvait inhiber les microARN-122 et réduire

de façon prolongée la virémie du VHC chez des chimpanzés infectés chroniquement. À l’exception d’une réduction du cholestérol sérique, aucun effet secondaire n’a été observé chez les animaux (Lanford et al., 2010). Ces résultats montrent la faisabilité et l’innocuité du SPC3649 dans un futur traitement contre le VHC chez l’humain. D’autres molécules très prometteuses, ciblant certains facteurs de l’hôte, sont en développement comme les inhibiteurs de cyclophilines ou encore des agents impliqués dans la régulation du métabolisme du cholestérol (Amemiya et al., 2008; Ciesek et al., 2009; Kapadia and Chisari, 2005).

8 Les modèles animaux dans l'étude du VHC

8.1 Le chimpanzé

Le chimpanzé partage plus de 98% d'homologie génétique avec l'être humain et il est utilisé de façon routinière pour étudier les maladies chez l'homme. Il s'agit de l'animal ayant le plus contribué à l'avancement des connaissances sur le VHC. Le génome du VHC a été cloné à partir d'un chimpanzé infecté expérimentalement par le virus HNANB en 1989 (Choo et al., 1989). Toutefois, malgré l'importante homologie entre les séquences génomiques, il y a des différences marquées entre l'humain et le chimpanzé. Par exemple, les deux espèces ne partagent aucune similarité des allèles HLA de classe I et il y a de nombreuses différences au niveau du système des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Rollier et al., 2007). Ces différences observées chez le chimpanzé ont un impact sur le développement et la progression de la maladie hépatique comparativement à l'humain. Le taux d'infection chronique au VHC chez le chimpanzé est de 39 % comparativement à 70-85% chez l'homme (Bassett, Brasky, and Lanford, 1998) (Hoofnagle and di Bisceglie, 1997). De plus, la maladie hépatique chez le chimpanzé est moins sévère; aucune fibrose ni cirrhose n'a encore été observée et le développement de carcinomes hépatocellulaires n'a été détecté qu'une seule fois jusqu'à aujourd'hui (Muchmore et al., 1988).

Le chimpanzé reste le seul modèle animal où l'on peut étudier les effets d'une infection aiguë au VHC car elle est souvent asymptomatique chez les patients. Dans le cadre d'expériences d'infections aiguës par le VHC, ce modèle animal permet d'étudier la réponse antivirale précoce et certains aspects de la pathogenèse comme la nécro-inflammation hépatique et l'augmentation des niveaux enzymatiques des transaminases hépatiques (Muchmore et al., 1988). Lors de l'infection par le VHC chez le chimpanzé, il y a une augmentation exponentielle de la réPLICATION virale et production de particules virales seulement trois jours après l'infection dans le sang de l'animal. Ensuite, cette surproduction de virus va diminuer et atteindre un plateau de 10^5 - 10^7 copies ARN/ml les semaines suivantes (Abe et al., 1992; Shimizu et al., 1990). Ce modèle animal permet aux investigateurs de prélever des biopsies de foie durant l'infection et d'étudier de façon plus détaillée la réponse immunitaire innée et adaptative intrahépatique au VHC (Bigger,

Brasky, and Lanford, 2001; Cooper et al., 1999; Shoukry et al., 2004b; Su et al., 2002). La majorité des connaissances sur l'immunobiologie du VHC ont été acquises grâce aux chimpanzés. Ce modèle animal s'est avéré indispensable dans l'évaluation de vaccins expérimentaux prophylactiques et thérapeutiques contre le VHC (Folgari et al., 2006). Pour des raisons financières et éthiques, les expériences faites chez le chimpanzé se limitent à un ou quelques animaux et ainsi la réalisation d'études avec ce modèle s'avère de plus en plus difficile pour la communauté scientifique.

8.2 Le modèle du rat immunotolérant

Alors que la plupart des modèles animaux de rongeurs sont immunodéficients, le modèle du rat immunotolérant est caractérisé principalement par la présence d'un système immunitaire complet. Pour ce faire, les fœtus de rats sont exposés à des cellules d'hépatocarcinomes humains Huh7 dans l'utérus durant la période de maturation de leur système immunitaire (Figure 14), plus précisément au jour 17 de la gestation. Un jour après la naissance, des cellules Huh7 sont injectées dans la rate des rats néonataux immunotolérants. Ces cellules ne sont pas rejetées et se greffent dans le foie de l'animal pour former 6% des hépatocytes totaux 14 semaines post implantation. Suite à l'infection des jeunes rats de 8 jours par la voie intrasplénique, des analyses d'immunohistochimie sur les tissus hépatiques ont montré qu'environ 62% des cellules Huh7 implantées expriment la protéine virale NS5A du VHC (Wu et al., 2005). Le niveau d'ARN viral maximal dans le sérum est de 2×10^4 copies/mL et peut persister plusieurs semaines. La capacité fonctionnelle des cellules immunitaires de rat présente un réel avantage pour ce modèle. Une réponse immunitaire adaptative contre le VHC serait envisageable, cependant il persiste une différence entre le complexe majeur d'histocompatibilité rat-homme dans la reconnaissance des antigènes du VHC présentés.

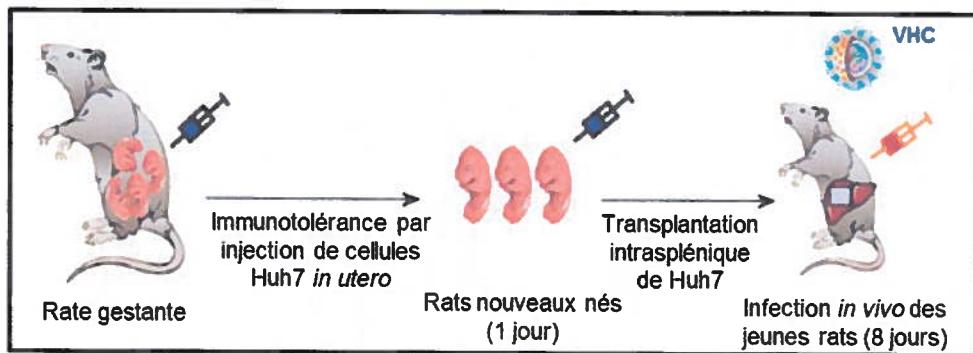


Figure 14 Modèle du rat immunotolérant
Adapté de Kremsdorff D. et al. 2007

8.3 Le modèle de la souris Trimera

La compagnie XTL Biopharmaceuticals (Rehovot, Israël) a mis au point le premier modèle chimérique murin-humain appelé Trimera (Ilan et al., 2002a). Le terme "Trimera" se réfère aux trois souches génétiques de tissus utilisés pour mettre au point la souris de ce modèle animal. Dans un premier temps, des souris normales ou BNX (*beige/nude/X-linked immunodeficient*) sont irradiées à dose létale et elles sont ensuite protégées par l'implantation de cellules de moelle osseuse de souris SCID, puis greffées sous la capsule rénale avec un fragment de foie humain infecté *ex vivo* par le VHC (Figure 15). Le fragment de foie est viable jusqu'à un mois dans la souris dû à l'irrigation sanguine importante à cet endroit. Après un mois, le fragment va se détériorer et perdre ses structures lobulaires hépatiques créant ainsi de la fibrose et de l'ischémie. Cette détérioration est probablement due à un manque de circulation sanguine portale menant à une diminution des facteurs de croissance et au manque de clairance de la bile (Galun et al., 1995). L'ARN viral peut être détecté dans le sérum des souris jusqu'à 1 mois et atteindre un titre maximal de 6×10^4 copies/mL. Une autre équipe de recherche a démontré qu'il était possible d'infecter *in vivo*, à l'aide d'inoculum humain VHC+, des souris NOD/SCID en utilisant un modèle similaire de greffe de tissus hépatiques humains. Le titre de la virémie varie entre 450 et 910 copies/mL dans le sérum des souris et il perdure 4 semaines (Maeda et al., 2004).

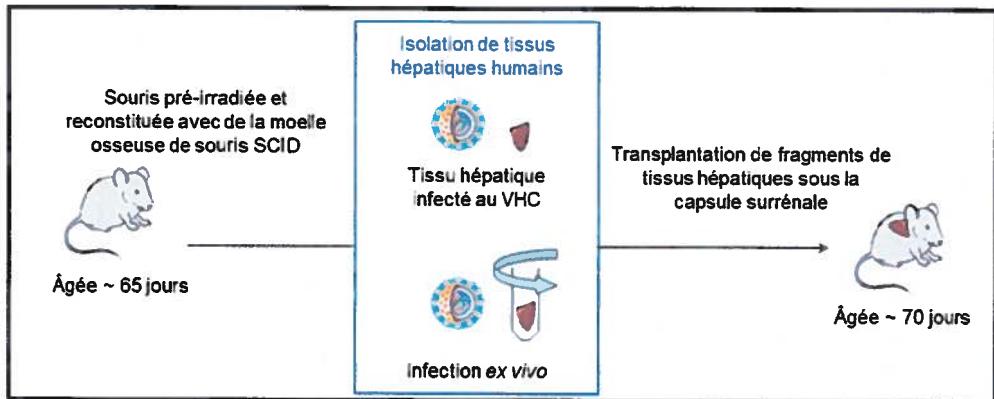


Figure 15 Le modèle de souris Trimera
Adapté de Kremsdorff D. et al. 2007

Plusieurs stratégies antivirales ont été testées avec le modèle Trimera par la voie d'infection *ex vivo*. Des souris infectées par le VHC ont été traitées par un inhibiteur du IRES ou avec un anticorps contre de la protéine de l'enveloppe E2 du virus. Ces traitements réduisent la virémie de 10 fois comparativement au groupe non traité (Eren et al., 2006; Ilan et al., 2002a). Lors de l'expérience, il a été démontré que le fragment de foie était fonctionnel et intact : 1) par la réapparition de la virémie suite aux traitements 2) par l'expression et la stabilité de l'ARN messager de l'albumine humaine.

Toutefois, ce modèle animal pour l'étude du VHC est techniquement difficile à élaborer en raison des procédures chirurgicales et de la faible disponibilité des fragments de foie humain. De plus, la virémie obtenue chez le Trimera est relativement faible et contribue à rendre ce modèle animal difficile à utiliser.

8.4 Le modèle de souris SCID-Alb/uPA

En 1990, le groupe de recherche du Dr Ralph Brinster a développé un modèle de souris transgénique dans lequel l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) est contrôlé par le promoteur du gène de l'albumine (Alb) dans le foie. Ce groupe de recherche avait comme objectif d'étudier l'hyperactivation du plasminogène et le traitement des désordres hémorragiques (Heckel et al., 1990). La surexpression du transgène uPA augmente les niveaux plasmatiques d'uPA, ce qui donne lieu à une hypofibrinogénémie et une hépatotoxicité créant des lésions au foie (Sandgren et al., 1991). La maladie hépatique chronique et la dégénérescence du foie de la souris Alb-uPA

crée un environnement propice à la repopulation de l'organe par des hépatocytes murins sains (Rhim et al., 1994) (Figure 16). Pour diminuer le rejet d'implantation d'hépatocytes xénogénique (ex. hépatocytes de rat), le modèle Alb-uPA a été croisé avec une souche de souris immunodéficiente tel que la *Swiss athymic (nu/nu)* Alb-uPA et la souris uPA-RAG2 pour la transplantation d'hépatocyte de marmotte (Dandri et al., 2001a; Rhim et al., 1995).

L'équipe du Dr Peterson a démontré qu'il était possible de transplanter des hépatocytes humain dans le modèle murin immunodéficient Alb-uPA (Dandri et al., 2001b). Toutefois, la repopulation du foie est plus faible comparativement à l'utilisation d'hépatocytes de souris ou de rats, puisque seulement 15% du parenchyme hépatique murin est repeuplé par les hépatocytes humains. Malgré la faible quantité d'hépatocyte dans le foie des souris, celles-ci peuvent être infectées par le VHB, mais elles ne sont pas susceptibles au VHC (Dandri et al., 2001b). L'augmentation du niveau de repopulation du foie des souris chimériques était nécessaire pour pouvoir étudier l'infection du VHC. Ce problème a pu être résolu en partie en sélectionnant des souris homozygotes pour le transgène uPA, ce qui augmente les chances d'implantation des hépatocytes humains et d'infection par le VHC. Dans ce modèle, le taux de sécrétion de l'albumine humaine est un indice de la fonction des hépatocytes humains implantés dans le foie de la souris. Un taux minimum de 250 µg/mL d'albumine humaine sanguine permet d'obtenir l'infection d'environ 75% des souris greffées (Mercer et al., 2001a).

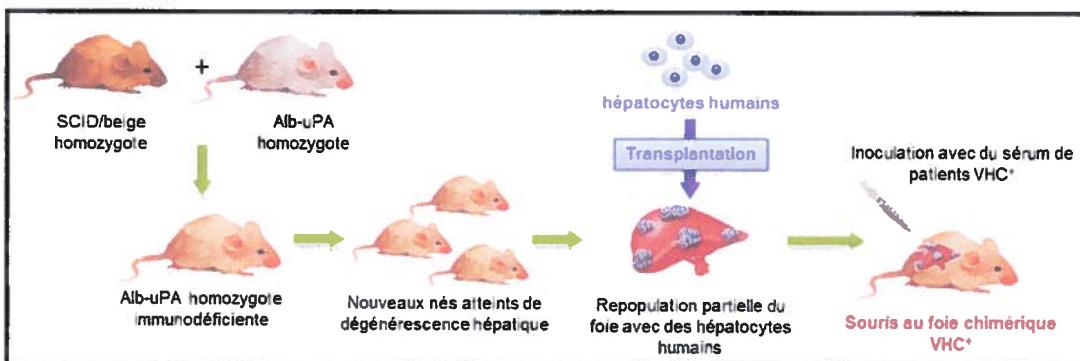


Figure 16 Modèle de souris SCID/Alb-uPA

Les souris possédant un foie chimérique humain peuvent être infectées à partir de sérum humain infecté par le VHC⁺ durant plusieurs mois avec des titres viraux élevés,

démontrant une réplication active du virus dans le foie des souris Alb-uPA. Les titres viraux les plus élevés observés sont de l'ordre de 10^6 et 10^7 copie/ml d'ARN VHC. De plus, suite à une infection à long terme, la souris ne démontre aucun signe d'hépatotoxicité (Mercer et al., 2001a; Meuleman et al., 2005).

La réponse antivirale innée a été caractérisée chez la souris Alb-uPA infectée par le VHC (Walters et al., 2006) par l'utilisation de profils de transcription. Chez les souris infectées, la réponse observée à l'ISG (*interferon stimulated gene*) est comparable à celle observée chez les patients infectés par le VHC. Un fait important est que les souris infectées avec le même inoculum, mais avec des hépatocytes humains provenant de donneurs différents, présentent différents profils de transcription. Ceci indique que les facteurs de l'hôte jouent un rôle clé dans la détermination de la réponse antivirale innée (Walters et al., 2006).

Néanmoins, le modèle de souris Alb-uPA s'est avéré utile pour déterminer l'efficacité de certains composés antiviraux. L'effet antiviral de l'IFN, qui est dépendante du génotype, a été observé chez les souris chimériques par le groupe de Chayama et Kneteman (Hiraga et al., 2007; Kneteman et al., 2006a). De plus, l'anti-protéase BILN-2061 associé à des risques de cardiotoxicité a été observés en premier lieu chez la souris Alb-uPA (Vanwolleghem et al., 2007). La cardiotoxicité du BILN-2061 a été observée par la suite chez des singes rhésus, ce qui a conduit à l'arrêt du développement clinique de ce composé. D'autres antiviraux ont été étudiés dans le modèle de souris SCID Alb-uPA, dont les inhibiteurs de la cyclophiline DEBIO-02578, l'inhibiteur de la polymérase NS5B HCV796 et le telaprevir, un inhibiteur de la NS3/4A (Hiraga et al., 2011; Inoue et al., 2007; Kneteman et al., 2009).

L'immunisation passive avec des IgG polyclonaux provenant de patients infectés par le VHC peut protéger de l'infection lorsqu'une souche virale homologue est utilisée (Vanwolleghem et al., 2008). De même, environ la moitié des souris Alb-uPA sont protégées contre l'infection par des souches hétérologues du VHC de génotype 1a lorsqu'elles sont traitées avec des anticorps monoclonaux humains dirigés contre la glycoprotéine de l'enveloppe E2 du virus (Law et al., 2008). De toute évidence, ces données indiquent que l'immunoprophylaxie passive est possible puisqu'elle est validée

par ce modèle animal. Les souris Alb-uPA pourraient ainsi être utiles dans l'identification d'anticorps neutralisants pour une utilisation clinique future. Le blocage de l'un des récepteurs du VHC *in vivo* pourrait s'avérer une alternative aux traitements antiviraux. Par exemple, un anticorps dirigé contre le CD81 humain a été en mesure de protéger des souris Alb-uPA de l'infection par le VHC (Meuleman et al., 2008).

Malheureusement, la mise au point et l'utilisation du modèle Alb-uPA n'est pas sans difficulté. La pression sélective pour obtenir et maintenir un haut niveau de chimérisme humain peut seulement être réalisée dans une souris Alb-uPA immunodéficiente homozygote. Cette condition entraîne des problèmes de fertilité chez celle-ci. De plus, pour produire ces souris, il est nécessaire d'avoir de nombreuses cohortes de souris hémizygotes reproductrices qui sont très dispendieuses (Brezillon et al., 2008). Dès les premières semaines de vie, les jeunes souris Alb-uPA homozygotes sont atteintes de lésions au foie et une intervention chirurgicale doit être effectuée pour implanter des hépatocytes humains. Cette procédure est assez compliquée, car les animaux sont susceptibles de faire des hémorragies (Heckel et al., 1990). En raison de ces facteurs et de la nécessité d'obtenir des hépatocytes humains de grande qualité, seulement un petit nombre de souris peuvent être générées, et ce à un coût élevé.

8.5 Modèles de souris FRG

Récemment, deux équipes de recherche ont mis au point le modèle murin immunodéprimé $\text{Rag2}^{-/-}\text{Il2rg}^{\text{null}}$ qui est déficient en l'enzyme fumarylacétoacétate hydrolase (FAH) impliquée dans la voie catabolique de la tyrosine (Azuma et al., 2007; Bissig et al., 2007) (Figure 17). L'accumulation de métabolites de la tyrosine est hépatotoxique; cette déficience enzymatique mène à la tyrosinémie héréditaire de type 1, une maladie métabolique sévère. Les patients atteints de cette maladie souffrent principalement d'atteinte hépatique conduisant le plus souvent au cancer du foie. L'un des traitements utilisés est l'administration orale de NTBC (2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl-1,3-cyclohexanedione), un inhibiteur qui bloque l'activité de l'enzyme hydroxyphénylpyruvate dioxygénase en amont du FAH et prévient ainsi l'accumulation des métabolites toxiques (Grompe et al., 1995; Lindstedt et al., 1992). Dans le modèle de

la souris FRG, les lésions hépatiques sont induites en diminuant la dose de NTBT progressivement jusqu'au moment de la greffe d'hépatocyte humain (Figure 18).

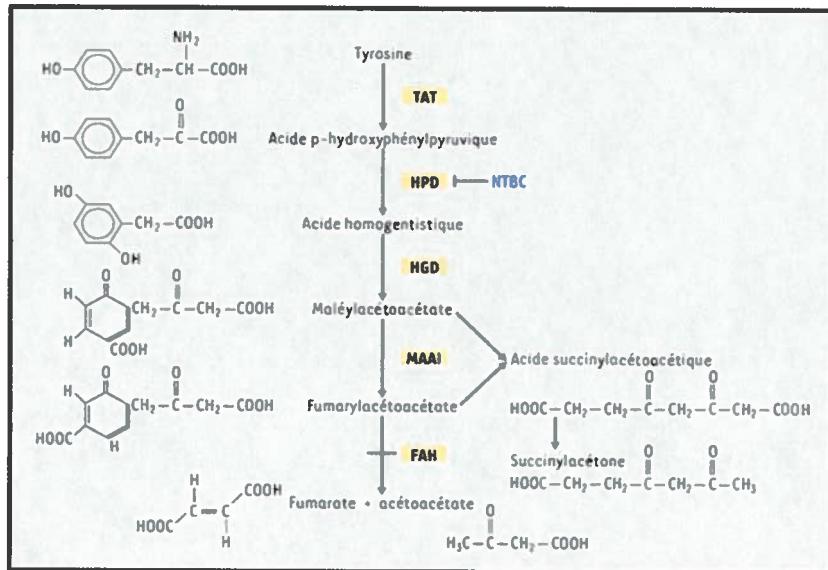


Figure 17 Voie catabolique de la tyrosine

La tyrosinémie héréditaire de type 1 est due à un blocage de la voie catabolique de la tyrosine au niveau de l'enzyme fumarylacetoacétate hydrolase (FAH). HGD: acide homogentisque dioxygénase, HPD: 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase, MAAI: maléylacetoacétate isomérase, NTBC: 2- (2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione, TAT:tyrosine aminotransférase. Tiré de Bergeron et al. 2003 (Bergeron, Jorquera, and Tanguay, 2003).

Suite à l'implantation d'hépatocytes humains dans la souche de souris FRG, le groupe de Bissig *et al.* obtient un pourcentage hautement reproductible de chimérisme de foie humain qui atteint 42%. Comparativement au modèle de souris Alb-uPA, les auteurs utilisent 3 à 5 fois plus d'hépatocytes humains lors de l'implantation pour obtenir un haut taux de chimérisme. Il existe une corrélation claire entre le chimérisme et l'albumine sérique humaine sécrétée par le foie des souris transplantées avec succès. Ceci procure du même coup un test simple pour vérifier l'état des greffes. Les auteurs ont démontré que les animaux greffés sont susceptibles à l'infection par le VHCcc et le VHC provenant de sérum de patients. Pour une raison inconnue, lors des infections dans les souris FRG, les titres viraux des échantillons cliniques étaient 1000 fois plus élevés ($10^3 \log$) que les surnageants de virus chimériques produits en culture cellulaire (VHCcc) (Bissig *et al.*, 2010). De plus, par immunohistochimie, les auteurs ont détecté la protéine NS5A du VHC dans le foie des animaux infectés, ce qui était techniquement difficile avec les

modèles antérieurs de même que chez l'humain (Liang et al., 2009). Comme dans les souris Alb-uPA, l'infection par le VHC peut seulement avoir lieu s'il y a présence d'un minimum de 10% d'hépatocytes d'origine humaine dans le foie de la souris. Il est intéressant de noter qu'au-dessus de 10% de chimérisme, il n'y a pas de corrélation entre le titre viral dans le sérum et le pourcentage d'implantation d'hépatocytes humains.

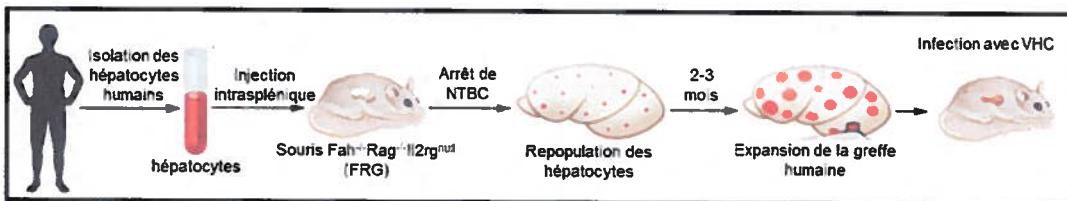


Figure 18 Le modèle de la souris FRG
Adapté de de Jong Y.P. 2010

Bissig *et al.* ont validé le modèle avec deux traitements antiviraux : IFN-peg en combinaison avec le Debio 025 et IFN-peg en combinaison avec la ribavirine (traitement standard). L'efficacité des deux traitements s'est avérée similaire sur une durée de 2 semaines contre le génotype 1a du VHC. Jusqu'à ce jour, ces souris constituent le modèle animal le plus avancé pour étudier l'infection par le VHC. Cependant, ce modèle est limité par une mortalité élevée et une susceptibilité variable à l'infection. Par ailleurs, l'absence d'un système immunitaire fonctionnel ralentit l'acquisition des connaissances sur les interactions hôte-VHC ainsi que l'évaluation d'agent d'immunothérapie et de vaccins. Un tableau comparatif des caractéristiques des modèles murins Alb-uPA et FRG est situé à la page suivante (Tableau 1)(de Jong, Rice, and Ploss, 2010).

Tableau 1 Comparaison entre les souris FRG et Alb-uPA

	Souris FRG	Souris Alb-uPA
Lésion hépatique		
Mutation	Déficience de l'enzyme fumarylacétate hydrolase Inductible à l'arrêt du NTBT	Surexpression de l'activation du plasminogène urokinase
Occurrence		In utero
Transplantation		
Age	Jeune ou adulte	7-21 jours après la naissance
Hépatocytes : adulte	+	+
Hépatocytes : fœtale	Non testé	-
Hépatocytes : dérivé-ES	Non testé	Non testé
Hépatocytes : dérivé-iSP	Non disponible	Non testé
Chimérisme humain	3%-97% (moyenne 42%)	Jusqu'à 99%
Production	Moyenne- haute	Faible
Problèmes	Développement de tumeur hépatique murine à long terme après l'arrêt de NTBT	Infertilité chez les souris transgéniques homozygotes, coagulopathie
Susceptibilité		
Hépatite C : VHCcc (genotype 2a)	+	+
Hépatite C : sérum de patient	+	+
Hépatite B	+	+
Pathologie relié à infection VHC		
Fibrose	-	-
Tumeur hépatique	-	-

ES, cellules souches embryonnaires; iSP, cellules souches pluripotentes induites 2010

Adapté de Ype P. de Jong *et al.*

8.6 Modèle murin chimérique et immunocompétent

Deux grandes stratégies sont actuellement poursuivies pour développer des modèles de souris immunocompétentes VHC: (i) le développement d'animaux transgéniques exprimant des facteurs humains spécifiques requis pour la réPLICATION virale et (ii) des souris chimériques contenant un foie humain et un système immunitaire. Dans une récente étude publiée dans la revue *Gastroenterology*, Washburn et ses collègues ont développé un modèle de souris chimériques permissives à l'infection du VHC et constitué d'un système immunitaire humain partiel (Washburn *et al.*, 2011). Les auteurs ont utilisé du foie humain fœtal à double escient, soit comme source de cellules souches humaines hépatocytaires (Hep) et comme source de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ (CSH). Une fois isolées et purifiées, ces cellules sont transplantées dans des souris immunodéficientes Rag2/IL2r^{-/-}/ Balb/c.

Afin de créer un environnement viable à l'implantation des cellules Hep humaines, la protéine de liaison au FK506 fusionnée à la protéine caspase 8 (AFC8) a été exprimée spécifiquement dans le foie de la souris par sa mise sous contrôle du promoteur du gène de l'albumine. En présence de la prodrogue AP20187, l'AFC8 dimérisé et cette dimérisation mène à l'apoptose des hépatocytes murins. La co-injection de cellules fœtales de foie et de CSH dans le foie des souris nouveau-nés conduit à un repeuplement significatif par les hépatocytes humains (Washburn et al., 2011). Ces résultats ont été démontrés par des analyses d'immunohistochimie et par la sécrétion d'albumine humaine.

La présence d'un faible titre en ARN viral a été détecté dans le foie des souris infectées et non pas dans le groupe témoin. Par ailleurs, des cellules lymphocytaires humaines CD4⁺ et CD8⁺ T, des NK, des plasmocytes et des cellules dendritiques myéloïdes ont été détectés dans le foie des souris humanisées. La réponse spécifique au VHC par les cellules T est montrée par l'expansion spécifique de lymphocytes T humains infectés par le VHC à partir des souris stimulées avec des peptides du VHC, et par coloration des cytokines intracellulaires des cellules CD4⁺ et CD8⁺. De plus, une infiltration des cellules leucocytaires est observée dans le foie des souris infectées. Les souris infectées développent une fibrose hépatique et les auteurs concluent que le modèle AFC8-hu HSC/Hep pourrait aussi permettre d'étudier certaines pathologies hépatiques provoquées par le VHC (Washburn et al., 2011).

Cependant, malgré ces résultats très prometteurs, plusieurs inconvénients limitent encore l'utilisation de ce modèle. Premièrement, le VHC y est détecté à de faibles niveaux dans le foie et il ne peut être détecté dans le sérum des souris infectées. Un second inconvénient important est l'absence de production d'anticorps spécifiques au VHC, dû à une reconstitution seulement partielle de la fonction des cellules B. Puisque les anticorps neutralisants semblent jouer un rôle important dans la pathogenèse du VHC et la persistance virale, l'absence d'anticorps spécifiques dans ce modèle entrave l'étude des mécanismes d'échappement immunitaire des anticorps neutralisants et ne permet pas la mise au point de vaccin.

Récemment, l'équipe du Dr Charles M. Rice à l'université Rockefeller de New York, a développé un modèle de souris génétiquement humanisé permettant l'entrée du VHC dans une souris possédant un système immunitaire complet (Dorner et al., 2011). Ils ont montré que l'expression des récepteurs CD81 et de l'occludine humains par des adénovirus dans le foie de la souris sont suffisants pour permettre l'entrée du VHC. Les auteurs ont utilisé un génome moléculaire biscistronique du virus exprimant la recombinase Cre (Bi-nlsCre-Jc1FLAG2 ou VHC-Cre). La recombinase Cre du virus va activer une région flanquée LoxP où est insérée un gène rapporteur luciférase dans le génome des hépatocytes de la souris transgénique Rosa26Fluc. Ainsi, la quantité de virus entré dans les hépatocytes de l'animal est mesurée par un signal de bioluminescence. Les auteurs ont démontré que le VHC-Cre peut être bloqué par immunisation passive par un anti-CD81 et anti-E2. De plus, ils ont démontré qu'il est possible d'induire une réponse immunitaire adaptative en immunisant la souris à l'aide d'un virus de la vaccine recombinant exprimant les protéines C-E1-E2-P7-NS2 du VHC génotype 1a. Suite à l'immunisation génique, les souris produisent des titres élevés d'anticorps contre la protéine de l'enveloppe du virus (E2), permettant une diminution de la susceptibilité contre certaines souches hétérologues de VHC-Cre (protéines structurales 1b, 2a, 4a). Il y a une corrélation claire entre le niveau de protection des anticorps anti-E2 et la quantité présente de ceux-ci dans le sérum de l'animal.

La présence d'un système immunitaire murin complet dans ce modèle animal pour étudier le VHC est un important avancement. Malheureusement, les hépatocytes murins ne peuvent maintenir la réPLICATION du VHC, probablement en raison d'une incompatibilité entre la machinerie de réPLICATION virale et le ou les facteur(s) impliqué(s) dans la réponse antivirale innée activée. Finalement, ce système reproduit seulement le premier cycle de réPLICATION du VHC et ne reflète en aucun cas l'équilibre naturel de l'infection.

8.7 Modèle de souris transgéniques et xénogreffe d'hépatocarcinomes humains

Les souris transgéniques sont produites par microinjection de gènes dans l'embryon de l'animal. Ainsi, il est possible d'intégrer n'importe quel gène placé sous le

contrôle de n'importe quel promoteur spécifique. Pour étudier la pathologie du foie, plusieurs souris VHC transgéniques ont été développées exprimant une ou plusieurs protéines du virus.

L'équipe de Koike *et al.* a produit une souris transgénique exprimant les protéines E1 et E2 de l'enveloppe du virus. Aucune évidence de dommage au foie n'est observé à long terme chez ces souris transgéniques (Koike et al., 1995). De plus, d'autres modèles de souris transgéniques VHC contenant qu'une des protéines de l'enveloppe en combinaison avec le gène core du virus n'ont pas présenté de dommage au foie (Kawamura et al., 1997; Pasquinelli et al., 1997). Cependant, certains groupes de recherche ont pu observer la formation de stéatose hépatique ainsi que la présence de carcinomes hépatocellulaires chez les souris transgéniques exprimant soit la protéine virale core, soit l'ensemble des protéines non structurales ou le génome entier du VHC (Kamegaya et al., 2005; Lerat et al., 2009; Moriishi et al., 2007; Tanaka et al., 2008). Cette grande variabilité dans les résultats peut s'expliquer par une relation entre la carcinogenèse hépatique associée à l'inflammation et les différentes souches de souris utilisées durant les expériences (Klopstock et al., 2009).

En utilisant un modèle de souris transgénique exprimant la protéine NS5A, Majumder *et al.* ont démontré que cette protéine virale pouvait inhiber l'apoptose hépatique médiée par le TNF en bloquant la voie du signal du TNF (Majumder et al., 2002). Le groupe de Sälberg a démontré que les souris transgéniques exprimant la protéine NS3/4 ne développent pas de maladie du foie spontanée, mais que les hépatocytes exprimant la protéine NS3/4 du virus deviennent résistants aux dommages hépatiques induits par le TNF- α . Un traitement avec un inhibiteur de la MAP kinase p38 peut faire revenir à la normale cette résistance au TNF- α conférée aux cellules (Frelin et al., 2006).

Un inconvénient majeur du modèle de souris transgénique est que le transgène est intégré en très grand nombre au hasard dans le génome de la souris. En comparaison à l'infection naturelle, les protéines virales sont typiquement surexprimées de façon non contrôlée. Certains effets des protéines virales peuvent être attribués à la surexpression

artificielle de celle-ci et/ou à une possible interférence avec la régulation des gènes localisés au site d'intégration du transgène (Ernst et al., 2007).

Récemment, un modèle de xénogreffes d'hépatocarcinomes humains chez la souris a été développé pour étudier la réPLICATION du VHC *in vivo*. Ce modèle utilise une lignée cellulaire Huh7 adaptée contenant un réplicon luciférase du VHC qui est injectée sous cutané ou dans le foie de la souris immunodéprimée SCID/beige. La réPLICATION de l'ARN du VHC a été mesurée dans le foie des souris et des xénogreffes de tumeurs sous-cutanées en utilisant un système d'imagerie en temps réel. Ce modèle a été utilisé pour évaluer les propriétés antivirales de l'IFN- α et de l'inhibiteur de protéase BILN 2061 (Zhu et al., 2006b). Un autre modèle de souris xénogreffé d'hépatocarcinomes humains a été développé en utilisant une lignée cellulaire Huh7 adaptée contenant un réplicon du VHC exprimant le gène rapporteur de la GFP (green fluorescent protein) (Hazari et al., 2011).

Malheureusement ces modèles animaux ne produisent pas de virus infectieux. Étrangement, la lignée cellulaire Huh7 adaptée contenant le réplicon rep114/ET a démontré une certaine résistance au traitement IFN- α *in vitro* (Zhu et al., 2006b). Par contre ce genre de modèle peut s'avérer intéressant car il est simple, peu coûteux, et il est facilement adaptable à n'importe quel laboratoire de recherche.

9. Hypothèse et objectifs de travail

Jusqu'à aujourd'hui, le développement de stratégies thérapeutiques efficaces a été fortement limité par les difficultés liées à l'établissement de modèles de réPLICATION *in vitro* et *in vivo* du VHC. L'objectif principal du projet de thèse est la mise au point d'un modèle murin simple, accessible et peu coûteux permettant la réPLICATION du VHC ainsi que la production de particules virales *in vivo*. Le modèle animal est basé sur la génération de tumeur humaine dans des souris immunodéficientes, à l'aide d'une lignée cellulaire hépatocytaire humaine tumorigénique Huh7, capable de former des carcinomes hépatocellulaires humains chez des souris immunodéficientes. Cette lignée cellulaire permissive au VHC JFH1 permet au virus de se propager dans la tumeur et des particules virales infectieuses sont ainsi sécrétées dans la circulation systémique de l'animal. L'établissement de ce modèle animal facilitera le criblage d'agents d'antiviraux contre le VHC pour l'industrie pharmaceutique et le milieu académique.

En complément du premier objectif, une partie de mon projet de thèse a pour but d'étudier l'interaction de la protéine autophagique ATG5 et de la polymérase NS5B du VHC. De nombreux virus à ARN simple brin de polarité positive induisent l'autophagie lorsqu'ils infectent les cellules de l'hôte. Récemment, il a été montré que les protéines autophagiques peuvent agir comme des facteurs proviraux lors de l'initiation de l'infection du VHC *in vitro*. Notre hypothèse est que la protéine autophagique ATG5, connue pour induire la formation de vésicules à doubles membranes intracellulaires, pourrait jouer un rôle important au niveau de la réPLICATION du VHC, plus spécifiquement au niveau des protéines du complexe de réPLICATION.

Les objectifs du projet de thèse sont : (I) Le développement d'une lignée cellulaire tumorigénique et permissible au VHC. (II) Mettre au point un modèle murin de xénogreffe d'hépatocarcinome humain permettant la réPLICATION du VHC et valider le modèle animal à l'aide d'agents antiviraux contre le VHC. (III) Étudier l'interaction de la protéine autophagiques ATG5 et de la polymérase NS5B du VHC et évaluer l'importance de cette interaction au cours de la réPLICATION du VHC *in vitro*.

CHAPITRE 2 : PREMIÈRE PUBLICATION

Novel HCV replication mouse model using human hepatocellular carcinoma xenografts. Guévin C, Lamarre A, Labonté P. Antiviral Res. 2009 Oct;84(1):14-22.

Résumé de la première publication

Titre : Développement d'un nouveau modèle murin de réPLICATION du VHC basé sur la xénograffe de carcinome hépatocellulaire humain.

En absence de petit modèle animal approprié pour l'étude du VHC, nous avons développé un modèle murin simple, permettant la réPLICATION du VHC ainsi que la production de particules virales infectieuses. Le modèle animal est basé sur la génération de tumeur humaine dans des souris immunodéficientes SCID/beige, à l'aide d'une lignée hépatocarcinome humain tumorigénique Huh7.7 infectée par le clone moléculaire JFH1 du VHC. Préalablement infectées par le VHC, ces tumeurs ont la capacité de sécréter des particules virales infectieuses dans le sang de l'animal. Suivant l'infection, les souris développent une virémie allant jusqu'à 10^5 GE/ml dans le sérum et de 10^7 GE/ μ g d'ARN VHC dans les tumeurs. Des analyses en immunohistochimie ont démontré que le VHC se répliquait activement à l'intérieur des tumeurs infectées par le virus. De plus, le virus provenant des souris infectées s'est avéré infectieux en culture cellulaire. Finalement, nous avons démontré que l'interféron- α et l'inhibiteur de protéase BIL-2061 pouvaient inhiber la réPLICATION *in vivo* des VHC de souche JFH1 produit en culture cellulaire (VHCcc). En conclusion, nous avons développé un modèle murin du VHC simple et peu dispendieux permettant de produire des particules virales infectieuses *in vivo*. Ce modèle animal sera d'une grande utilité dans la caractérisation et le développement de nouveaux agents antiviraux contre le VHC.

Contribution des auteurs

Carl Guévin : A fait les expériences pour toutes les figures et génération des figures, rédaction du manuscrit et corrections suite aux réponses des «reviewers» du journal.

Alain Lamarre : Contribution à la révision du manuscrit.

Patrick Labonté : Révision et correction du manuscrit.

Novel HCV replication mouse model using human hepatocellular carcinoma xenografts

Carl Guévin¹, Alain Lamarre¹ and Patrick Labonté^{1*}

¹. Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier
(INRS-IAF), 531 blvd. Des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

*Corresponding author: patrick.labonte@iaf.inrs.ca

Footnote

The authors have no commercial or other association that might pose a conflict of interest.

P.L.: This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (312225). P.L. received salary support from the “Fonds de la Recherche en Santé du Québec” (#8328) and C.G. was supported by a doctoral grant from the “Fondation Armand-Frappier”.

*Corresponding author: Patrick Labonté

INRS-Institut Armand-Frappier

531 blvd des Prairies

Laval, QC, Canada

H7V 1B7

E-mail:patrick.labonte@iaf.inrs.ca

Tel: (450) 687-5010 ext.4331

Fax: (450) 686-5314

Abstract

In the absence of an immunocompetent mouse model for HCV replication, we developed a convenient xenograft mouse model that produces infectious viral particles. For this purpose, HCV-permissive tumours were generated in SCID/beige mice using a tumorigenic population of the human hepatocarcinoma-derived Huh7 cell line. Following infection, HCV RNA increased in the mouse sera and the human tumour by up to 10^5 GE/ml and 10^7 GE/ μ g of RNA, respectively. Immunohistochemistry analysis revealed that active viral replication had taken place within the tumour. Moreover, virus recovered from infected mice sera was readily infectious in cell culture. Finally, we showed that interferon- α and the protease inhibitor BILN-2061 inhibited HCVcc strain JFH1 replication *in vivo*. In conclusion, we developed a simple and inexpensive mouse model that allows the production of infectious HCV particles *in vivo*. Such a model will be an extremely valuable tool for the characterization of promising drug candidates.

1. Introduction

The Hepatitis C virus (HCV) is a leading cause of chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma worldwide ((Sarbah and Younossi, 2000)). 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- α and ribavirin ((Di Bisceglie, McHutchinson, and Rice, 2002)). HCV is a positive-strand RNA enveloped virus that is classified as a *Hepacivirus* within the *Flaviviridae* family ((Simmonds et al., 2005)). The RNA genome is ~9.6 kb in length and produces a single polyprotein of 3010–3040 amino acids that is processed by a combination of viral and cellular proteases, giving rise to at least 10 individual proteins ((Bartenschlager, Frese, and Pietschmann, 2004)). Even though recent work has led to the development of *in vitro* HCV infection systems, the evaluation of experimental vaccines and therapeutic agents against HCV still requires the development of animal models ((Lindenbach and Rice, 2005; Wakita et al., 2005b; Zhong et al., 2005b)). There is no convenient animal model in which to study HCV replication *in vivo*. In fact, the only known natural host for HCV is human, although chimpanzee can be infected experimentally and is still considered to be the best animal model available ((Bukh, 2004; Shoukry et al., 2004a; Thimme et al., 2002)). However, ethical issues, limited availability, and the high cost of these primates severely limit their use. As an alternative, attempts to produce mice models have met with moderate success ((Ilan et al., 2002b; Kneteman et al., 2006b; Labonte et al., 2002b; Mercer et al., 2001b)). The existing mice models are expensive and technically challenging, which limits their usefulness for drug screening as well as for the study of HCV biology. We have

previously reported the generation of a murine model with which to study HCV replication based on the establishment of HCV-infected tumours in immunodeficient mice ((Labonte et al., 2002b)). For this purpose, a highly tumorigenic Huh7 subclone (HuT7-3) was developed and was able to promote the formation of human hepatocarcinoma subcutaneously as well as orthotopically in nude mice ((Labonte et al., 2000a)). In this model, HCV-positive human sera were used as the source of infectious particles to initiate infection in mice. Viral replication was achieved but viral titres were low, due to the poor susceptibility of the human hepatoma cells to blood-derived HCV particles. Using the cell culture HCV (HCVcc) strain JFH1 and the Huh7 cell line, this difficulty can now be overcome (Wakita et al., 2005). Recently, a xenograft mouse model with an implanted mouse-adapted luciferase replicon-containing Huh7 cell line has been described ((Zhu et al., 2006a)). The replication level of the HCV RNA replicon in individual mice was monitored by measuring luciferase activity. However, this replicon-based mouse model does not produce HCV particles.

In this report, we describe the development and application of a simple, inexpensive and reliable mouse model that allows the production of infectious HCV particles *in vivo*. By using a genotype 2a infectious clone that replicates and produces infectious virus in cell culture, we demonstrated that strain JFH1 can establish robust infections in SCID/beige mice harbouring human hepatocarcinoma xenografts. Furthermore, we validated the model using two well-known HCV inhibitors, Intron-A (IFN- α 2b) and BILN-2061. This *in vivo* model of HCV infection should provide a drug discovery asset with which to guide the selection of anti-HCV drug candidates.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female C.B17 SCID (SCID), SCID/beige and CD-1 Nu/Nu mice (5 to 13 weeks old) were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Constant, Qc, Canada) and were housed and treated as required by the Canadian Council of Animal Care.

2.2. Cell culture

Huh7, Huh7-7, HuT7-3 and HEK-293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Gibco, Carlsbad, CA).

2.3. HCV RNA transcription and transfection

The HCVcc strain JFH1 was obtained from Dr Takaji Wakita, having been derived from a Japanese patient with fulminant hepatitis ((Kato et al., 2001)). To generate genomic JFH1, the pJFH1 plasmid was linearized at the 3' end of the HCV cDNA by *Xba*I digestion. The linearized DNA was then purified and used as a template for *in vitro* transcription (MEGAscript; Ambion, Austin, TX). *In vitro*-transcribed HCV RNA or total cell RNA was transfected into cells using a modified electroporation protocol ((Krieger, Lohmann, and Bartenschlager, 2001)). Briefly, trypsinized cells were washed twice with serum-free medium and resuspended to a final concentration of 1×10^7 cells/ml. Ten micrograms of HCV RNA were then mixed with 0.4 ml of the cells in a 4 mm cuvette. A

Gene Pulser system (BioRad Laboratories, Hercules, CA) was used to deliver a single pulse of 0.27 kV, 100 OHMS, 960 µF.

2.4. Infection with HCV JFH1

Supernatant from Huh7 cells harvested 60 days post-transfection was used to infect Huh7-7 cells (10–15% confluence) at an M.O.I. of 0.05 in a T75 flask. Prior to subcutaneous injection of infected cells in mice, the ongoing infection was confirmed by indirect immunofluorescence. For *in vivo* infection of the tumour, intratumoral injection of 600 FFU of JFH1 virus was performed. For *in vitro* infection with mice sera, Huh7 cells were seeded 24 h before infection at a density of 1×10^5 cells/well in a six-well plate and incubated overnight with mouse sera (10^3 HCV GE). The infection was confirmed by immunofluorescence at 3 and 15 days post-infection.

2.5. Implantation of subcutaneous xenograft

The tumorigenicity of Huh7, Huh7-7 and HuT7-3 cells was evaluated by inoculating 5×10^6 cells, resuspended in 0.2 ml of PBS, subcutaneously into the right flanks of 6–8 week female SCID/beige mice. The tumour volume and the body weight of mice were evaluated once a week. Mice were euthanized at four weeks post-injection or when tumour volume was >2500 mm³. Tumours were removed and processed for RNA, proteins, histological and immunohistochemical analysis.

2.6. Adaptation of Huh7 cells to form solid tumour growth

A SCID/beige mouse harbouring a (2000 mm³) xenograft human tumour was sacrificed and the tumour was excised, dissected into 2–5 mm cubes and transplanted subcutaneously into anaesthetized SCID/beige mice. This process was repeated seven times and the resulting tumour was digested with collagenase treatment (Labonte et al., 2000) and expanded *in vitro* to create the Huh7-7 tumorigenic cell population.

2.7. Drug treatment

When tumours reached 300–500 mm³, mice were randomly divided into three groups and injected once a day in the subcutaneous suprascapular area of the animal with IFN- α 2b (Intron A; 20000 IU) or BILN-2061 30 mg/kg or saline solution (control). Treatments lasted 5 and 4 days for Intron-A and BILN-2061, respectively. No sign of toxicity was observed in any treated animal.

2.8. Quantitative RT-PCR

Total cellular RNA from tumour tissue samples and viral RNA from mice sera were extracted and purified with Trizol as described by the manufacturer (Invitrogen). The cDNA was prepared from 250 ng of total cellular RNA or 50 μ l of sera from mice. Briefly, RNAs were incubated for 3 min at 70 °C then cooled on ice for 2 min before the addition of 4 μ l of RT-Buffer 5X (Invitrogen), 2 μ l DTT (0.1 M), 1 μ l random primer p(dN6) (100 ng/ μ l), 1 μ l dNTP (20 mM), 20 U of RNAsin and 100 U of MMLV reverse-transcriptase. Samples were incubated for 10 min at 25 °C and 1 h at 37 °C. To inactivate

the MMLV, samples were incubated for 15 min at 70 °C and the cDNA was diluted to a final volume of 200 µl with RNase-free water. The primers used for amplification were: 5'UTR-R: 5'-GAGTGGGTTATCCAAGAAAG-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 the reaction mixture containing 8.6 µl H₂O, 0.5 µl of probe FAM-UTR (12.5 µM) CCGGAATTGCCGGAAAGACTG, and 0.25 µl (90 µM) of each HCV primer. For the internal control, the 18S Ribosomal RNA Kit was used according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystem). The mixture was completed with 12.5 µl of the Taqman Universal Master Mix 2X (Applied Biosystem) and the amplification was performed according to the manufacturer's instructions in a Rotor-Gene RG-3000 (Corbet Research).

2.9. Indirect immunofluorescence

Huh7 or Huh7-7 infected cells were seeded on a cover glass (2×10^4 cells per cover glass) and were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Staining of HCV NS5A was performed using a polyclonal anti-NS5A antibody (obtained from Dr O Nicolas, ViroChem Pharma) for 1 h (1:200). Human albumin was detected using a polyclonal anti-human albumin (Dako) (1/100). Both antibodies were used in PBS 3% BSA, 10% FBS and 10% triton X-100. Antibodies were washed four times in PBS and bound antibodies were detected by incubation for 1 h with anti-rabbit goat Alexa 488 antibody at a dilution of 1:500. Unbound antibodies were washed four times with PBS and nuclei were stained

with DAPI. Immunofluorescence analysis was performed with a Nikon microscope TE2000.

2.10 Titration of infectious HCV

Titration was performed as previously described (Zhong et al., 2005). Briefly, cell supernatants or mice sera were 10-fold or 2-fold serially diluted in complete DMEM and used to infect 10^4 Huh7.5 cells in 96-well plates (Corning). The virus was incubated with cells for 3 h at 37 °C and then washed away with PBS and supplemented with fresh complete DMEM. The level of HCV infection was determined 3 days post-infection by immunofluorescence staining for HCV NS5A. The viral titre was expressed as focus-forming units per millilitre of supernatant (ffu/ml), determined by the average number of NS5A-positive foci detected at the highest dilutions.

2.11. Histological and immunohistochemical analysis

Briefly, all tissue sections were fixed in formalin and embedded in paraffin. Sections from tumours were cut at 3 to 5 µm, mounted on glass, and dried overnight at 37 °C. All sections were then deparaffinized in xylene, rehydrated through a graded alcohol series, and washed in PBS. For immunohistochemistry, the sections were incubated with 0.6% H₂O₂ in normal goat serum for 20 min to block endogenous peroxidase activity (Vectastain, ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA), followed by a rabbit polyclonal anti-core 1:100 (obtained from Dr Denis Leclerc, Université Laval, Canada) or

a rabbit polyclonal anti-human albumin (Dako) for 1 h at room temperature. The sections were then washed twice in PBS for 5 min each and incubated for 1 h in biotinylated anti-rabbit IgG (Vectastain, ABC kit) at room temperature. After three washes in PBS for 5 min each, the sections were incubated with the ABC complex (Vectastain, ABC kit) for 30 min at room temperature. Sections were then washed in PBS and developed with diaminobenzidine (DAB, DAKO detection kit; DAKO, Carpinteria, CA) for 7 min and counterstained with haematoxylin.

2.12. Western Blot analysis

Cell lysates were prepared by treating tissues with ice-cold lysis buffer [20 mM Tris/HCl (pH 8), 10% NP40, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 8), and protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)] for 20 min on ice followed by centrifugation at 4 °C for 15 min to sediment particulate materials. The protein concentration was measured using the BCA Protein Assay Kit (Pierce; Rockford, IL). After SDS-PAGE electrophoresis, protein samples were transferred to an Immuno-Blot PVDF membrane for protein blotting (Bio-Rad) for 45 min. Non-specific binding sites were blocked for 1 h in PBS-5% skimmed milk and the membrane was stained for 1 h with the primary antibodies. The antibodies used were anti-NS5A 1:2000, anti-core 1:1000 (obtained from Dr Denis Leclerc, Laval University, Canada) and anti-E2 1:500 (mouse monoclonal, Biodesign International, Saco, ME). After incubation with the primary antibody, the membranes were washed four times 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 Immunoresearch) or goat anti-mouse (1:5000, Promega). The signals were developed with SuperSignal™ West Pico chemiluminescent substrate (Pierce).

2.13. Flow cytometry

Cell surface expression of TFR, CLDN-1 and CD81 was monitored by recovering the cells using Versene (TFR and CLDN-1) or Trypsin, 0.25% EDTA (CD81) (Invitrogen). Approximately 1×10^6 cells were fixed in PBS 4% formaldehyde for 10 minutes and blocked in PBS 3% FBS for 30 minutes at 4 °C. Cells were stained for 1 h at 4 °C with anti-TFR (BD Pharmingen™), anti-CLDN1 (Abnova) and anti-CD81 (Santa Cruz Biotechnology) antibody at 1 µg/ml in PBS 3% FBS. Cells were washed twice in PBS and incubated for 30 minutes at 4 °C with mouse-specific secondary antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:1000) (Jackson ImmunoResearch) in PBS 3% FBS, respectively. For the detection of the LDLR at the cell surface, cells were resuspended in Versene™ and treated as for the detection of CD81. The primary antibody was an anti-LDLR (C7) (Santa Cruz Biotechnology) used at 1 µg/ml and the secondary antibody was a mouse-specific secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:1000) (Jackson ImmunoResearch) respectively. All samples were analysed immediately using a FACSCalibur™.

2.14. Sucrose density gradient analysis

Supernatant from JFH1-infected Huh7, Huh7-7 cells and pooled infected mice sera were centrifuged at 4,000 rpm for 5 min to remove cellular debris. Samples (800 µl) were loaded by overlaying onto a TNE buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA)-based 10–50% sucrose gradient followed by centrifugation at 120,000 × g for 16 h at 4 °C using a SW60Ti rotor in a Beckman Coulter Optima™ L-100 Ultracentrifuge. Fractions of 275 µl were collected from the bottom of the gradient. Buoyant densities were determined by refractometry on a Fisher Refractometer (Fisher Scientific). The fractions were analysed by qRT-PCR to detect HCV RNA, and the FFU were calculated as described above.

3. Results

3.1. Development of human hepatocellular carcinoma in xenograft mouse model

We have previously reported the generation of a highly tumorigenic clone of the Huh7 cell, named HuT7-3 (Labonte et al., 2000). The HuT7-3 cells were able to establish solid white tumours either subcutaneously or in the mouse liver. However, the HuT7-3 cells were not susceptible to HCV JFH1 infection and normal Huh7 cells were used for further development of the human xenograft in mice. Indeed, subcutaneous injection of Huh7 cells has been shown to induce tumours in immunodeficient mice ((Chiba et al., 2006; Esposito et al., 2006; Kito et al., 2003)). In our hands, the tumorigenicity of Huh7 cells was low and resulted in 20–38% of successful xenograft implantation in immunocompromised mice (Table 1). As expected, SCID/beige mice were more susceptible to xenograft development than SCID or CD1 nu/nu mice. The initial expansion of the tumours was apparent at 2 to 3 weeks post-injection with tumours reaching a volume of 2000 mm³ about 2 to 3 weeks after the onset of tumour growth. Interestingly, all tumours (28 out of 28) were extremely vascularized with a colouration similar to that of liver tissue (Fig. 2A). Metastases were never detected grossly or microscopically. Importantly, cells recovered from mouse tumour tissue were still susceptible to HCV JFH1 virus *in vitro* (data not shown, and Table 1).

With an unsatisfactory success rate of 20–38% using normal Huh7, we decided to improve the capability of the global Huh7 population to initiate tumour formation. We thus performed serial passages of 2–4 mm³ tumour block from mouse to mouse. The resulting Huh7 population, named Huh7-7 (seven *ex vivo* serial passages) was very

efficient at inducing tumours while retaining susceptibility to HCVcc infection *in vitro* (Table 1).

During the selection of Huh7 populations with enhanced tumorigenicity, we observed that tumorigenic populations had a tendency to lose their susceptibility to JFH1 infection but not in the case of the Huh7-7 cells. Therefore, we decided to compare the Huh7-7 population to normal Huh7 cells. First, we analysed the cell surface expression of key receptors for HCV infection such as CD81, Claudin-1 and LDL-R as well as the transferring receptor (TFR or CD71), a well-known receptor that is involved in iron uptake in the liver (Fig. 1A). Although minor divergences were observed in the expression of TFR, CLDN-1 and LDLR, two very distinct CD81 expression profiles were observed in Huh7-7 cells. Indeed, only 75% of the cell populations expressed CD81 at a level comparable to normal Huh7 cells. The reduction in CD81 expression in the remaining 25% of the population did not seem to affect their susceptibility to JFH1 since >90% of the cells were readily infected *in vitro* and *in vivo* (Fig. 1C, right and 2A). Furthermore, no significant divergence in viral replication was observed in Huh7 and Huh7-7 cells (Fig. 1C, left) and the specific infectivity of the virus recovered in the supernatant of Huh7 (1/1960) and Huh7-7 (1/1533) cells was comparable. In fact, we and others have proposed that CD81 expression is essential for HCV infection (Labonte et al., 2009; Koutsoudakis et al., 2007). However, it has been clearly shown that CD81-independent infection occurs in a mixed population where the virus can spread from the cells expressing CD81 to those that do not express it (Timpe et al., 2008).

We also analysed the state of the virus secreted *in vitro* by the Huh7-7 population (Fig. 1D, right). As expected, the most infectious virus was present in the lower density

fractions (1.06–1.1 g/ml) whereas the virus present in the highest density fractions (1.13–1.16) was less infectious. Interestingly, even within the peak of low density virus, the specific infectivity increased significantly in the lightest fractions, suggesting that the quantity of lipids associated with the viral particles is important (Fig. 1D; fraction 9 and 10).

3.3. Viremia in the HCV xenograft mouse model

To initiate viral replication in mice, two different approaches were evaluated. The first method consisted of the intratumoral injection of HCV JFH1 in naïve tumours and the second method was based on the development of tumours using human cells previously infected *in vitro* (Fig. 2B and C). All tumours developed using the Huh7-7 cells were extremely vascularized and expressed human albumin (Fig. 2A). HCV titres were determined by measuring the number of copies of positive-strand HCV RNA in mouse sera using quantitative RT-PCR (Taqman). Viremia was analysed weekly until mice were sacrificed at 4 weeks post-infection. HCV viremia was often detectable as soon as 1 week post-implantation and increased in parallel with tumour size. Furthermore, viremia persisted in animals until sacrifice and the virus titres found in CD1 nu/nu mice sera were similar to those observed in SCID/beige mice (10^3 – 10^5 GE/ml) (Fig. 2D). Control mice that were injected with naïve Huh7 showed no detectable HCV RNA titres in their sera (data not shown).

3.4. Viral replication in human hepatocarcinoma xenografts

To investigate the ability of Huh7 tumours to sustain HCV JFH1 replication, animals bearing infected tumours were sacrificed, and tumours were removed and processed for RNA, protein and immunohistochemical analysis. Levels of viral RNA replication were determined by calculating the amount of HCV genome equivalent (GE) by quantitative RT-PCR in tumour tissues harvested 4 weeks post-injection. It is noteworthy that the quantity of HCV GE per mg of tissue was shown to be relatively similar in all tumours tested, ranging from 1.7 to 3.9×10^7 HCV GE/mg of tissue (Table 2). Therefore, the amounts of HCV RNA in the tumour were proportional to tumour size. However, the levels of HCV RNA found in mouse sera fluctuated, which suggests that virus secretion from the tumour is not directly proportional to the quantity of infected cells. Finally, both structural and non-structural HCV proteins were easily detected in all tumours by western blot analysis (Fig. 3A).

To visualize the extent of infection within the tumour at a cellular level, immunohistochemistry analysis using antibodies directed against the HCV core protein was performed. The results clearly indicate that within the tumour, nearly 100% of cells express the HCV core protein (Fig. 3B). As a control, mock infected tissue did not show any specific colouration. Moreover, the liver of infected mice remained negative for HCV RNA and core proteins as analysed by qRT-PCR and IHC (data not shown).

3.5. Virus recovered from mice is infectious in vitro

To demonstrate that virus detected in the mouse serum is infectious, sera from three different mice were used to infect naïve Huh7 cells. It has previously been suggested that *in vivo* passage of HCVcc increases the specific infectivity of the virus secreted

(Lindenbach et al., 2005). We also observed a significant increase in the specific infectivity of the JFH1 virus recovered from mice sera (Table 3). Interestingly, JFH1 specific infectivity increased over time elapsed *in vivo*. Taken together, these results indicate that the specific infectivity obtained *in vitro* and *in vivo* are consistent with previous observations and increases during *in vivo* growth ((Lindenbach and Rice, 2005; Wakita et al., 2005b; Zhong et al., 2005b)). Fig. 4A shows a representative set of data demonstrating that HCV JFH1 virus recovered from mouse sera can readily infect and propagate in naïve Huh7 cells *in vitro*. To determine whether the virus secreted in the bloodstream of the mouse segregated into two major peaks, we performed a sucrose gradient centrifugation. Again, the results suggest that the virus is secreted both bound to lipoproteins (1.06–1.1 g/ml) and as unbound virus (1.13–1.16 g/ml) (Fig. 4B).

3.6. Validation of the HCV xenograft mouse model with antiviral agents

To demonstrate the usefulness and the simplicity of this xenograft model, two well-known HCV inhibitors (Intron-A and BILN-2061) were evaluated for their capacity to reduce viremia in infected mice. As anticipated, both inhibitors showed an antiviral effect when administered subcutaneously. Indeed, at 3 or 4 days post-administration of Intron-A or BILN-2061, respectively, all mice showed a decrease in their HCV viremia (Fig. 5A). Furthermore, the viral titre became undetectable in one of the mice treated with Intron A and with BILN-2061 but this did not occur in the saline group. In fact, the viremia increase in all animals of the saline group produced a >1 log variation over a 5-day treatment period when compared to the IFN-treated mice (Fig. 5B). This result is very similar to recent reports using the SCID-Alb/uPA or HCV replicon mouse model

(Kneteman et al., 2006; Zhu et al., 2006). To confirm that the reduction in viremia observed in response to the interferon was due to viral inhibition and not inhibition of tumour growth, we compared the development of the tumour in the presence or absence of Intron-A (Fig. 5C). The results indicated that the administration of Intron-A did not significantly affect tumour development, indicating that the reduction in viremia observed in response to Intron-A was due to its antiviral effect. Interestingly, in our experiment, the NS3 protease inhibitor (BILN-2061) was more potent than interferon, with a clear decrease in viremia over a 4-day treatment period (Fig. 5B). In the case of BILN-2061, all three mice injected with the compound showed normal tumour development when compared with the saline group (data not shown) and no adverse effect was observed upon visual examination.

4. Discussion

In vivo replication of HCV in a simple reproducible system is essential for the evaluation of new classes of antiviral agents. *In vitro*, the replication of HCV or HCVcc is restricted to primary hepatocytes and Huh7 cells respectively ((Fournier et al., 1998a; Molina et al., 2007a; Wakita et al., 2005b)). Therefore, strategies have been developed to produce animal models based on both types of cell ((Ilan et al., 2002b; Kneteman et al., 2006b; Labonte et al., 2002b; Mercer et al., 2001b)). Here, we report the first simple and convenient mouse model that used a Huh7-derived cell population to produce infectious HCV in mice.

Previous reports indicated that Huh7 cells could be tumorigenic ((Chiba et al., 2006; Esposito et al., 2006; Kito et al., 2003)). However, in our hands, the engraftment rate of several sources of Huh7 was inconsistent from experiment to experiment ((Labonte et al., 2000a) and unpublished data). Therefore, the isolation of a stable population of tumorigenic and HCV-permissive Huh7 cells became necessary to facilitate the standardization of the model. For this purpose, small pieces of tumour were serially passaged in mice. The resulting population, named Huh7-7, remained as susceptible to HCV JFH1 infection as the normal Huh7 cells but showed a significant improvement in the engraftment success rate (Table 1).

To simplify the methodology and to normalize the results, we choose to engraft human cells that had been infected *in vitro*. Indeed, this approach resulted in tumours in which almost 100% of cells were infected, and a rapid onset of viremia (Fig. 3B). Therefore, the quantities of HCV RNA found in animals were proportional to the size of the tumours (Table 2). As an alternative, we also infected mice harbouring naive Huh7 tumours by intratumoral injection of HCV JFH1, and observed efficient infection of the animal (Fig. 2C). It is interesting to note that it was possible to detect the virus in the sera of the mice at low buoyant density, indicating the secretion of infectious particles coated with lipoproteins. In this situation, the virus recovered from animals was more infectious than its equivalent obtained *in vitro*, suggesting that the quality of the JFH1 virus improves *in vivo*.

In this study, we used an HCVcc of genotype 2a (strain JFH1). Several chimeric HCVcc expressing the structural proteins for all six HCV genotypes have also been developed and could be tested in this animal model as well ((Gottwein and Bukh, 2008)). Obviously, an infectious full-length genotype 1 HCVcc would be extremely valuable for the screening of antiviral drugs. However, the replication of genotype 1 HCVcc, such as H77S, is weak *in vitro* and needs to be improved prior to the development of a robust model ((Yi et al., 2006b)).

Although the *in vivo* model presented here cannot be used to study HCV pathogenesis or the antiviral immune response, it should provide a drug discovery asset with which to guide the selection of anti-HCV drug candidates. Currently, in the absence of a convenient HCV mouse model, HCV inhibitors are often developed without any efficacy data obtained in animals. Indeed, human trials are realized solely based on efficacy data

collected *in vitro* and on safety and pharmacokinetic profiles. The simplicity and the convenience of the model presented here should allow its utilization at an early stage in the profiling of a compound and give a more accurate indication of the ability of a compound to block viral replication and infection in an *in vivo* setting.

Figure legends

Fig. 1. (A) Cell surface expression of transferrin receptor (TFR), low-density lipoprotein receptor (LDL-R), CD81 and claudin-1 (CLDN-1) on Huh7-7 and Huh7 cells. Isotypic control antibody (filled gray curve), Huh7 cells (thin line), Huh7-7 cells (thick line). (B) Detection of human albumin protein by immunofluorescence in HEK-293, Huh7 and Huh and Huh7.7 cells. (C) (Left) HCV replication following infection with JFH1 virus in Huh7 and Huh7.7 cells. Infected cells were harvested at the indicated time points post-infection. Intracellular RNA was analysed by qRT-PCR and displayed as genome equivalents (GE)/ μ g of total RNA. (Right) Immunofluorescence staining of HCV NS5A at 15 days post-infection. (D) Sucrose gradient sedimentation of infectious HCVcc. Supernatant from infected Huh7 (left) and Huh7-7 (right) cells. The specific infectivity (infectious titre/ RNA copies) is also indicated for fraction 6, 7, 9 and 10 (in red).

Fig. 2. (A) (Left) Haematoxylin and eosin (H&E) staining of a human hepatocarcinoma xenograft tumour in SCID/beige mice. Original magnification 40X. Letter B indicates the presence of blood vessels and letter N indicates necrotic areas in tumour tissues. The upper inset represents a macroscopic view of a human hepatocarcinoma xenograft tumour removed from a SCID/beige mouse. (Right) Immunohistochemical staining of mouse liver tissue and its corresponding human HCC with an anti-human albumin antibody. (B) (Left) Experimental procedure of the HCV-infected xenograft mouse model. Huh7-7 cells infected for 14 days were injected subcutaneously into SCID/beige mice and followed for 4 weeks. (Right) Analysis of the JFH1 RNA viremia in two representative mice. Black

arrows show blood sample collection time points. (C) (Left) Experimental procedure of *in vivo* infection of ongoing tumours. (Right) Analysis of the JFH1 RNA viremia in three representative mice. (D) Viremia measured at 4 weeks post-infection in SCID/beige mice (open diamond, n=30) and CD-1 Nu/Nu mice (open square, n=7).

Fig. 3. Immunohistochemistry and expression of HCV JFH1 proteins in tumours isolated 4 weeks post-injection of HCV-infected Huh7 cells. (A) Western blot analysis of viral protein cores, E2 and NS5A, from tumours of uninfected (UI) and infected animals (I). (B) Immunohistochemical analysis of tumour tissues from mock infected or 28-day infected SCID/beige mice using an antibody against the HCV core protein.

Fig. 4. HCV particles secreted in the mouse sera are infectious *in vitro*. (A) Huh7 cells infected for 15 days with mouse sera were analysed by immunofluorescence for the presence of the HCV NS5A protein. Magnification 100X. (B) Buoyant density of the JFH1 virus from the serum of a mouse at 4 weeks post-infection.

Fig. 5. Effect of HCV inhibitors on HCV replication *in vivo*. (A). Subcutaneous injection of Intron-A and BILN-2061 was initiated when the tumour volume reached 250 mm³. Intron-A was administered at 20,000 IU/day for 5 days (n=4), BILN-2061 at 30 mg/kg/day for 3 days (n=3) and saline once daily for 5 days (n=3); each bar represents an individual mouse. Dashed lines represent the limit of detection of the qRT-PCR. (B) Fold

changes of HCV RNA viremia in mice treated with saline, Intron A or BILN-2061. Comparison was made between day 0 and day 5 (saline and Intron A) or day 0 and day 4 (BILN-2061). (C) IFN- α 2b treatment did not affect the tumour growth rate. Tumour size in mice treated with 20,000 IU IFN/days for 5 days (n=5) or saline solution (n=6). Error bars show SD.

Acknowledgements

We thank T Wakita for providing pJFH1 and pJFH1-GDD; J Bedard for BILN-2061; B Willems for Intron A; O Nicolas and D Leclerc for the anti-NS5A and anti-core antibodies, respectively; H Jacomy for technical assistance. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (312225). P.L. received salary support from the “Fonds de la Recherche en Santé du Québec” and C.G. was supported by a doctoral grant from the “Fondation Armand-Frappier”.

References

- Bartenschlager, R., Frese, M., Pietschmann, T., 2004. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63, 71-180.
- Bukh, J., 2004. A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* 39, 1469-1475.
- Chiba, T., Kita, K., Zheng, Y. W., Yokosuka, O., Saisho, H., Iwama, A., Nakauchi, H., Taniguchi, H., 2006. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 44, 240-251.
- Di Bisceglie, A. M., McHutchinson, J., Rice, C. M., 2002. New therapeutic strategies for hepatitis C. *Hepatology* 35, 224-231.
- Esposito, V., Palescandolo, E., Spugnini, E. P., Montesarchio, V., De Luca, A., Cardillo, I., Cortese, G., Baldi, A., Chiriacchi, A., 2006. Evaluation of antitumoral properties of the protease inhibitor indinavir in a murine model of hepatocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12, 2634-2639.
- Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., Domergue, J., Maurel, P., 1998. In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* 79, 2367-2374.
- Gottwein, J. M., Bukh, J., 2008. Cutting the gordian knot-development and biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems, in: Maramorosch, K., Shatkin, A. J., Murphy, F.A. (Eds.), *Advances in Virus Research*, Elsevier Academic Press Inc, San Diego, pp. 51-133.
- Ilan, E., Arazi, J., Nussbaum, O., Zaiberman, A., Eren, R., Lubin, I., Neville, L., Ben-Moshe, O., Kischitzky, A., Litchi, A., Margalit, I., Gopher, J., Mounir, S., Cai, W. Z., Daudi, N., Eid, A., Jurim, O., Czerniak, A., Galun, E., Dagan, S., 2002. The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: A model for evaluation of agents against HCV. *J. Infect. Dis.* 185, 153-161.
- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T., Wakita, T., 2001. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J. Med. Virol.* 64, 334-339.
- Kito, M., Matsumoto, K., Wada, N., Sera, K., Futatsugawa, S., Naoe, T., Nozawa, Y., Akao, Y., 2003. Antitumor effect of arsenic trioxide in murine xenograft model. *Cancer Science* 94, 1010-1014.
- Kneteman, N. M., Weiner, A. J., O'Connell, J., Collett, M., Gao, T. J., Aukerman, L., Kovelsky, R., Ni, Z. J., Hashash, A., Kline, J., Hsi, B., Schiller, D., Douglas, D., Tyrrell, D. L. J., Mercer, D. F., 2006. Anti-HCV therapies in chimeric scid-Alb/uPA mice parallel outcomes in human clinical application. *Hepatology* 43, 1346-1353.
- Koutsoudakis, G., Hermann, E., Kallis, S., Bartenschlager, R., Pietschmann, T., 2007. The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J. Virol.* 81, 588-598.
- Krieger, N., Lohmann, V., Bartenschlager, R., 2001. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J. Virol.* 75, 4614-4624.

- Labonte, P., Begley, S., Guevin, C., Asselin, M-C., Nassoury, N., Mayer, G., Prat, A., Seidah, N.G., 2009. PCSK9 impedes HCV infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology*. 50, 17-24.
- Labonte, P., Kadhim, S., Bowlin, T., Mounir, S., 2000. Inhibition of tumor growth with doxorubicin in a new orthotopically implanted human hepatocellular carcinoma model. *Hepatology Research* 18, 72-85.
- Labonte, P., Morin, N., Bowlin, T., Mounir, S., 2002. Basal replication of hepatitis C virus in nude mice harboring human tumor. *J. Med. Virol.* 66, 312-319.
- 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., Rice, C. M., 2006. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3805-3809.
- Lindenbach, B. D., Rice, C. M., 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436, 933-938.
- Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C. H., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., Lakey, J. R. T., Tyrrell, D. L. J., Kneteman, N. M., 2001. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* 7, 927-933.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Gruber, P., Ghersa, P., Smolarsky, M., Funaro, A., Malavasi, F., Larrey, D., Coste, J., Fabre, J. M., Sa-Cunha, A., Maurel, P., 2007. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J. Hepatol.* 46, 411-419.
- Sarbah, S. A., Younossi, Z. M., 2000. Hepatitis C: An update on the silent epidemic (vol 31, pg 125, 2000). *J. Clin. Gastroenterol.* 30, 125-143.
- Shoukry, N. H., Sidney, J., Sette, A., Walker, C. M., 2004. Conserved hierarchy of helper T cell responses in a chimpanzee during primary and secondary hepatitis C virus infections. *J. Immunol.* 172, 483-492.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I. T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J., Widell, A., 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42, 962-973.
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H. C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R. H., Chisari, F. V., 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15661-15668.
- Timpe, J. M., Stamatakis, Z., Jennings, A., Hu, K., Farquhar, M. J., Harris, H. J., Schwarz, A., Desombere, I., Roels, G. L., Balfe, P., McKeating, J. A., 2008. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralization antibodies. *Hepatology* 47, 17-24.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z. J., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T. J., 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11, 791-796.

- Yi, M., Villanueva, R. A., Thomas, D. L., Wakita, T., Lemon, S. M., 2006. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 2310-2315.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G. F., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T., Chisari, F. V., 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 9294-9299.
- Zhu, Q., Oei, Y., Mendel, D. B., Garrett, E. N., Patawaran, M. B., Hollenbach, P. W., Aukerman, S. L., Weiner, A. J., 2006. Novel robust hepatitis C virus mouse efficacy model. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 3260-3268.

Figures

Table 1

Tumorigenicity of Huh7 in immunocompromized mice.

Cell line	Cell susceptibility to HCVcc <i>in vitro</i>	Mice strain	Number of mice with tumor	Percent of mice with tumor
HuT7-3 ^a	No	CD1 nu/nu	5/5	100
Huh7 ^b	Yes	CD1 nu/nu	2/10	20
		SCID	2/6	33
		SCID/beige	14/32	38
Huh7-7 ^c	Yes	SCID/beige	27/30	90

^a Colony of Huh7; highly tumorigenic (Labonté et al., 2003).

^b Normal Huh7; low tumorigenicity.

^c *Ex vivo*-selected subpopulation of Huh7; medium tumorigenicity.

Figure 1

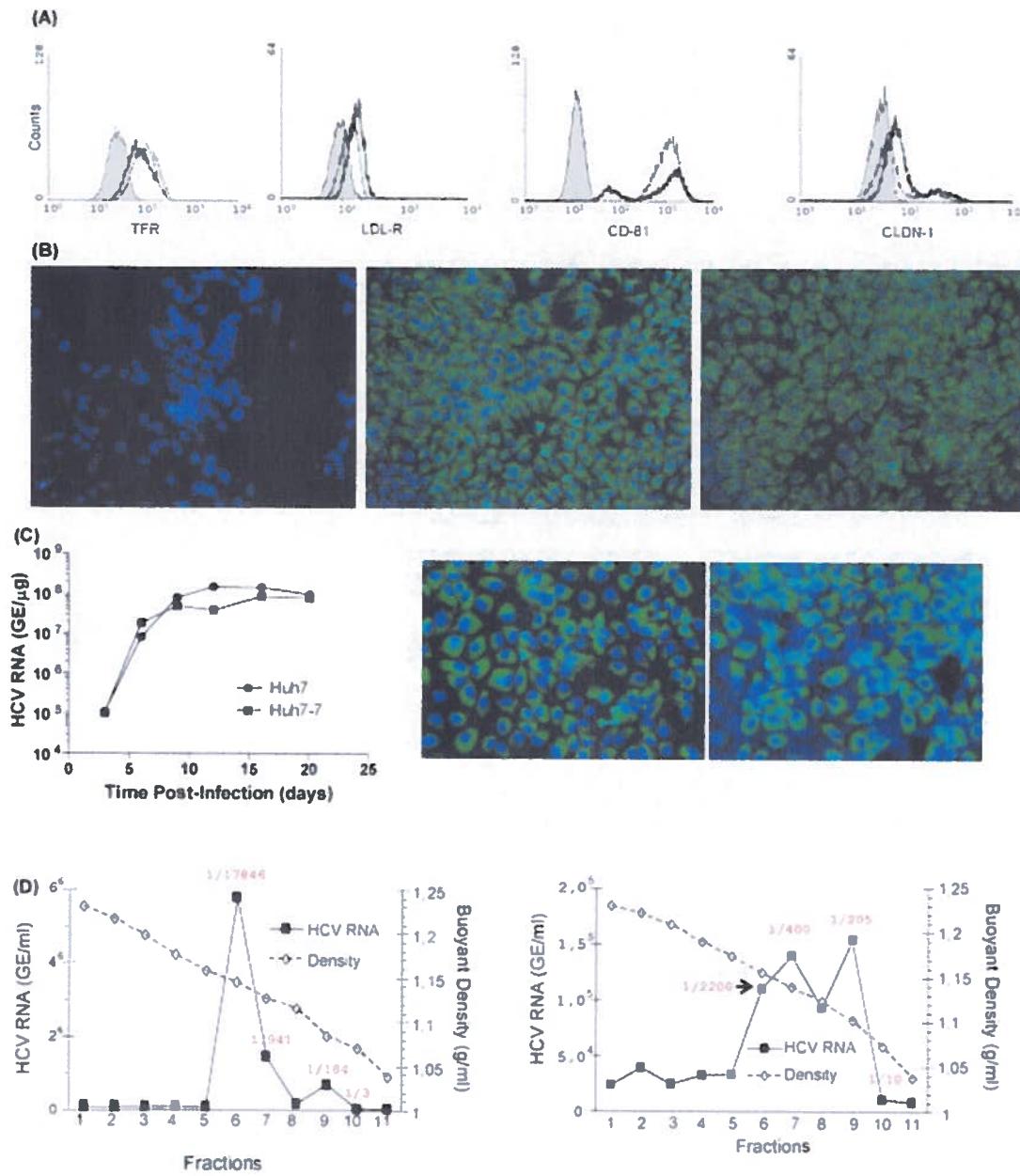


Figure 2

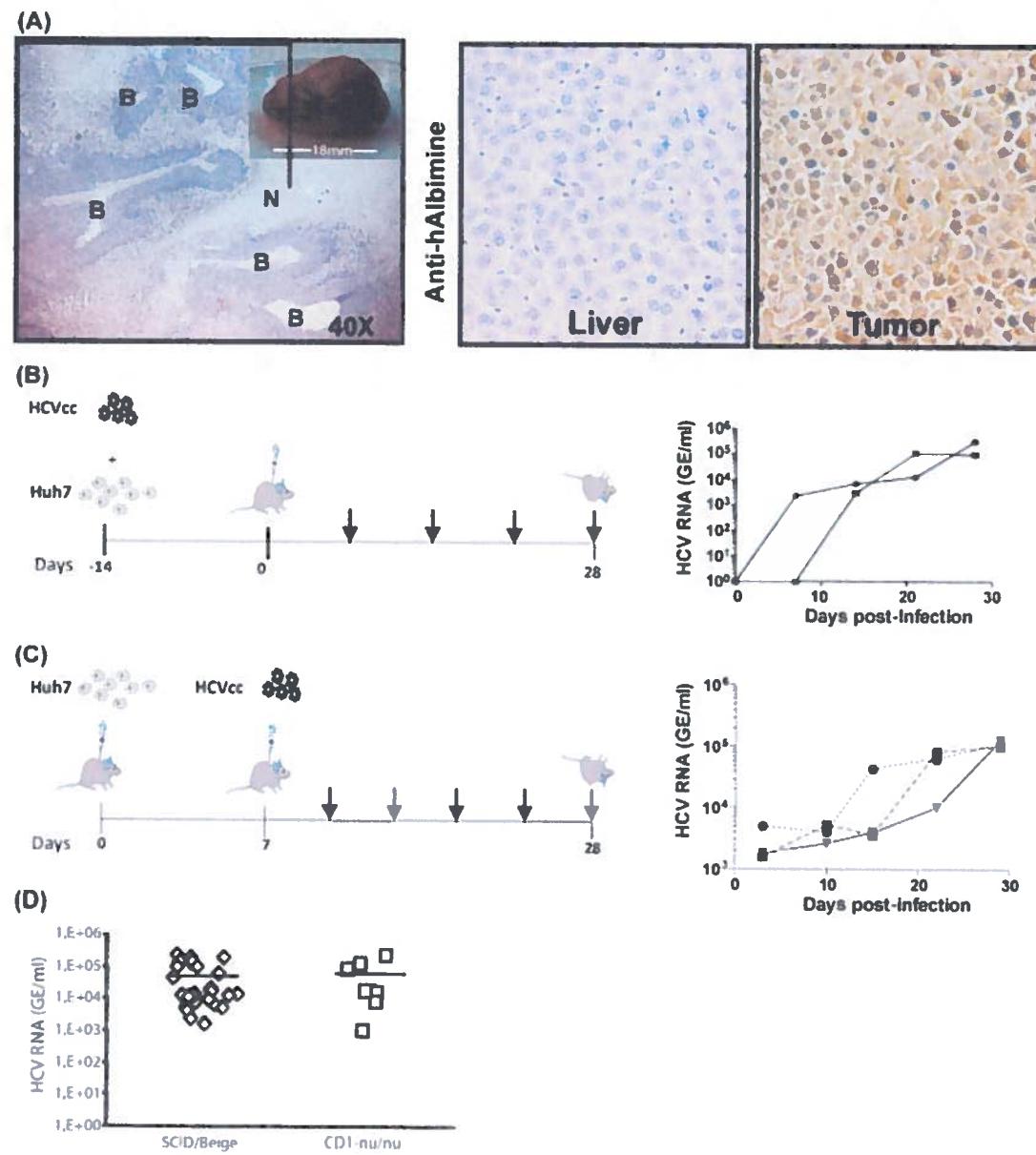


Figure 3

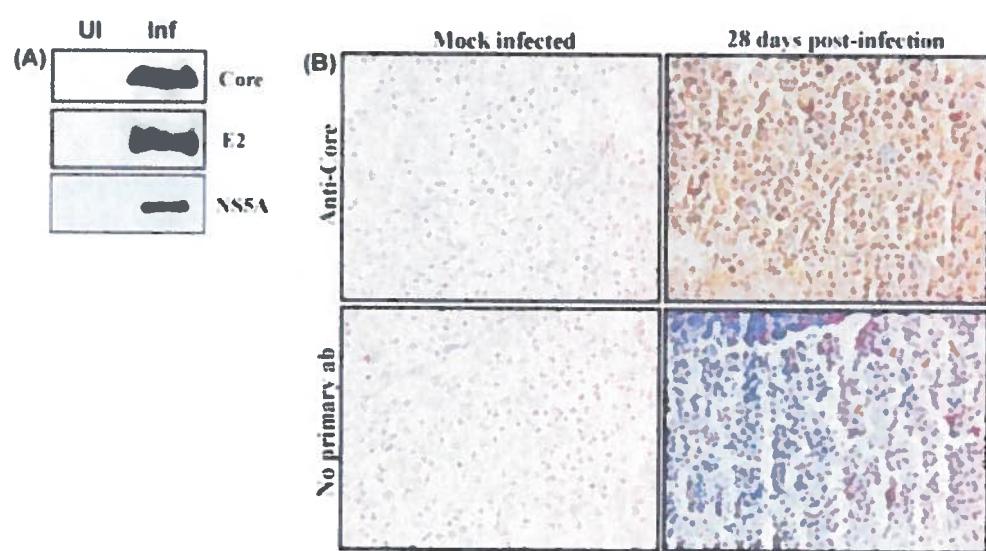


Figure 4

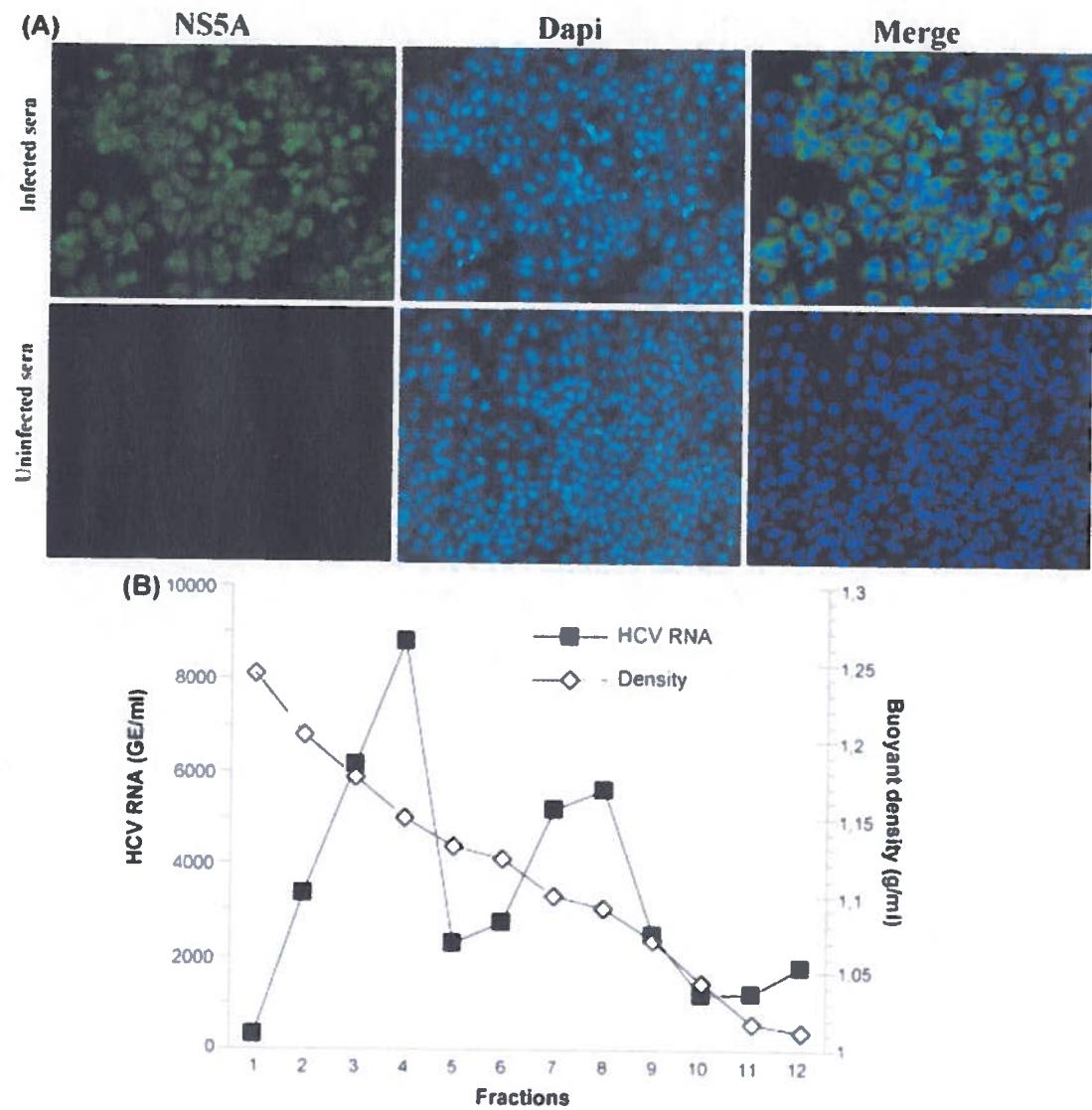


Table 2

Relationship between HCV RNA and tumor size.

Tumor size	Tumor (mm^3)	Serum (GE/ml)	Tumor (GE/mg of RNA)	Tumor (GE/mg of tissue)	Total (GE/mouse)
+	726	3.0×10^4	1.7×10^7	1.7×10^7	1.2×10^{10}
++	1800	1.0×10^4	2.6×10^7	1.8×10^7	3.2×10^{10}
+++	3890	3.8×10^5	1.4×10^7	3.9×10^7	1.5×10^{11}

Table 3

Recovery of cell culture infectivity from HCVcc-infected mice.

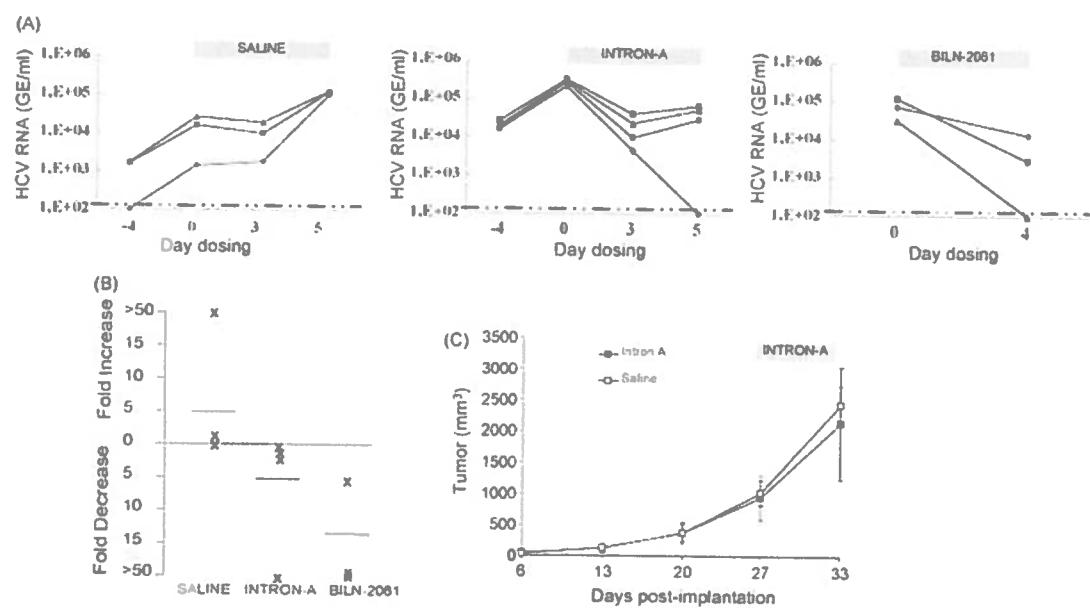
Virus preparation	Time <i>in vivo</i> (weeks)	Time <i>in vitro</i> (weeks)	Infectivity (FFU/ml)	Specific infectivity ^b (infectious virion/RNA)
JFH1 ^a	n/a	3	1030	1/1533
Mouse A	1	n/a	90	1/689
Mouse B	1	n/a	60	1/525
Mouse C	2	n/a	720	1/152

n/a, not applicable.

^a Stock of HCVcc produced in Huuh7-7 cells.

^b Average of two quantification.

Figure 5



CHAPITRE 3 : DEUXIÈME PUBLICATION

Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection. Guévin C, Manna D, Bélanger C, Konan KV, Mak P, Labonté P. Virology. 2010 Sep 15;405(1):1-7.

Résumé de la deuxième publication :

Titre : Interaction transitoire entre la protéine autophagique ATG5 et la protéine virale ARN polymérase ARN-dépendante (NS5B) du virus de l'hépatite C au début de l'infection.

L'autophagie est un processus cellulaire catabolique important par lequel la protéine Atg5 déclenche la formation de vésicules à double membrane (DMV). Il a été démontré, lors de l'infection virale, que les DMV pouvaient héberger le complexe de réPLICATION de certains virus à ARN de polarité positive tels que le virus de l'hépatite murine (MHV), le poliovirus et le virus de l'artérite équine. Récemment, il a été démontré que les protéines autophagiques peuvent agir comme facteurs provirals pouvant favoriser l'initiation de l'infection du VHC. Dans cet article, nous avons identifié une interaction entre la protéine autophagique ATG5 et la protéine NS5B du VHC. L'interaction physico-chimique ATG5/NS5B a été confirmée par des analyses de co-immunoprecipitation et marquage métabolique. De plus, nous avons observé une co-localisation entre ATG5 et NS4B, une protéine virale impliquée dans la formation d'un réseau membranaire désigné « *membranous web* ». À deux jours post-infection, nous avons observé, par analyses en immunofluorescence, une forte co-localisation entre ATG5 et NS5B dans les régions périnucléaires des cellules infectées. Toutefois, cette co-localisation s'est avérée négative après cinq jours post-infection, suggérant que le VHC utilise ATG5 comme un facteur proviral lors de l'initiation de l'infection. Finalement, l'inhibition de l'expression d'ATG5, à l'aide de siRNA spécifiques, permet de bloquer la réPLICATION du VHC.

Contribution des auteurs

Carl Guévin : Production du virus VHC JFH1. Expériences pour les figures (4B, 5), préparation des figures (1, 2, 3, 4B, 5), Rédaction du manuscrit et corrections suite aux réponses des «reviewers» du journal.

David Manna : Expériences pour la figure (4A).

Claudia Bélanger : Révision du manuscrit

Kouacou V. Konan: Production de la figure 4A et révision du manuscrit.

Paul Mak : Révision du manuscrit.

Patrick Labonté : Expériences figures (1,2, 3). Révision et correction du manuscrit.

Rapid communication

Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection

**Carl Guévin^a, David Manna^b, Claudia Bélanger^a, Kouacou V. Konan^b, Paul Mak^c,
Patrick Labonté^{a,*}**

^a Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier (INRS-IAF),
531 blvd. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7.

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State
University, University Park, PA 16802.

^c Infectious Diseases, Wyeth Research, Pearl River, NY, USA

Present Address: University of Massachusetts Medical School Department of
Surgery, 364 Plantation Street, Worcester MA 01605

*To whom correspondence should be addressed.

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boulevard des Prairies

Laval, Qc, Canada H7V1B7

e-mail: patrick.labonte@iaf.inrs.ca

Abstract

Autophagy is an important cellular process by which ATG5 initiates the formation of double membrane vesicles (DMV). Upon infection, DMV have been shown to harbor the replicase complex of positive-strand RNA viruses such as MHV, poliovirus and equine arteritis virus. Recently, it has been shown that autophagy proteins are proviral factors that favor initiation of hepatitis C virus (HCV) infection. Here, we identified ATG5 as an interacting protein for the HCV NS5B. ATG5/NS5B interaction was confirmed by co-IP and metabolic labeling studies. Furthermore, ATG5 protein colocalize with NS4B, a constituent of the membranous web. Importantly, immunofluorescence staining demonstrated a strong colocalization of ATG5 and NS5B within perinuclear regions of infected cells at 2 days postinfection. However, colocalization was completely lacking at 5 d.p.i., suggesting that HCV utilizes ATG5 as a proviral factor during the onset of viral infection. Finally, inhibition of autophagy through ATG5 silencing block HCV replication.

Key words: HCV, autophagy, ATG5, RdRp, NS5B, siRNA

Abbreviations: HCV, Hepatitis C virus, ATG5, autophagy-related genes 5, DMV, double membrane vesicles.

Introduction

There is compelling evidence that replication of all positive-stranded RNA viruses requires the formation of virus-induced membrane vesicles and that DMV are the sites of genome replication for some positive-stranded RNA viruses such as PV, MHV, EAV, dengue virus, coronavirus and coxsackievirus (Gosert et al., 2002; Lee et al., 2008a; Pedersen et al., 1999; Schlegel et al., 1996; Suhy, Giddings, and Kirkegaard, 2000; Wong et al., 2008). In cells, DMV derived from the endoplasmic reticulum membranes can be produced through the ubiquitous autophagy pathways (Klionsky and Emr, 2000). Autophagy, which has been well characterized in yeast, is an essential process by which bulk protein degradation and organelle turnover take place (Kim and Klionsky, 2000; Mizushima et al., 1998).

In response to a limited supply of amino acids due to environmental depletion, the autophagy process will generate a new pool of amino acids required for cellular homeostasis. Recently, the contribution of an autophagy protein, ATG5, to viral replication has been demonstrated (Prentice et al., 2004). Indeed, production of MHV particles is profoundly reduced (>99 %) in ATG5 -/- knockout (KO) embryonic stem cells (Prentice et al., 2004). In this system, expression of ATG5 in ATG5-/ cells restores virus production. The relationship between ATG5 and MHV replication may come from the ability of ATG5 to initiate the formation of DMV, which have been observed in MHV-infected cells (Gosert et al., 2002; Mizushima et al., 2001). As seen for dengue virus-2 (DV2), when autophagy is blocked by ATG5-KO MEF cells, extracellular DV2

virus titers are reduced by 3-fold compared to those from wild-type MEF cells (Lee et al., 2008a).

Altered vesicles, called the membranous web, have been observed in cells harboring HCV replicons (Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003). Because HCV replicons replicate autonomously in Huh-7, it has been proposed that the membranous web that contain the HCV replication complexes represents the genuine site of viral replication (Gosert et al., 2003; Moradpour et al., 2003). In HCV-infected cells, accumulation of lipid droplets, shown to be essential for HCV replication, has been observed in the proximity of the membranous web (Miyanari et al., 2007a). Given the involvement of autophagy at the site of replication of other positive-stranded RNA viruses, are the autophagy proteins or structure involved in HCV replication? In that regard, Tanida and colleagues recently showed that Atg7 silencing decreased the levels of infectious HCVcc by about 40% whereas intracellular HCV RNA and protein levels remained unchanged (Tanida et al., 2009). At the same time, another group demonstrated that autophagy proteins (ATG4b, Beclin-1) are only required for the initiation of incoming HCV RNA translation/replication (Dreux et al., 2009).

To identify novel cellular factors that may play an essential role in HCV RNA replication, we have previously screened a human liver cDNA library for proteins interacting with the HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). Here we report that ATG5, a protein required for the formation of DMV in embryonic stem cell

(Mizushima et al., 2001), specifically interacts with HCV NS5B. We propose that the NS5B/ATG5 interaction may be required for the initial onset of HCV replication.

Results

ATG5 interacts specifically with HCV NS5B protein

Using HCV NS5B Δ 21 protein as a bait in the yeast two-hybrid system, we identified positive clones from a human liver library. The clones that showed the strongest blue color (MEL 1 gene activation) on SD (-Leu, -Trp, -His, -Ade/+X α -gal) plates were chosen for further characterization. Two of these positive clones matched the sequence of the human eukaryotic initiation factor 4AI (eIF4AI), recently identified as an interacting protein for HCV NS5B (Kyono, Miyashiro, and Taguchi, 2002). Two more clones corresponded to the EMBL/GeneBank/DDBJ accession number Y711588a. This gene is highly homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* ATG5 gene (Hammond et al., 1998). ATG5/NS5B interaction was confirmed in the yeast two-hybrid system using the full-length human ATG5 gene amplified from a human liver cDNA library (Clontech) (Fig. 1). As a control, a panel of proteins (RAR- β , RAR- α , HCV core and nonstructural protein: NS3_{prot}, NS3_{hel}, NS4A and NS4B) cloned in the GAL4 DNA binding domain was tested for interaction with ATG5. From this panel, only HCV NS3_{prot} protein gave a weak signal but the interaction was not characterized further (data not shown).

To demonstrate a physical interaction between ATG5 and NS5B proteins, we performed co-IP on radio-inert or metabolically labeled yeast cells co-expressing ATG5 and NS5B. We used yeast cells in this study because co-transfection of Huh-7 cells with c-myc-NS5B and HA-tagged ATG5 resulted in low level expression of ATG5 protein. Yeast extracts were immunoprecipitated with monoclonal antibody against either the c-myc or the HA tag, followed by separation on SDS-PAGE. As shown in Fig. 2A, an immunoreactive band (lane 2) that corresponds to the size of the NS5B protein (68 kDa; lane 4) was co-immunoprecipitated with ATG5. This band was not present when the extracts were immunoprecipitated with monoclonal anti-5A antibody (lane 1) or without any antibody (Protein A/G sepharose beads alone) (lane 3). The bands corresponding to the 50 and 25 kDa molecular weight are the heavy and light chains, respectively, of the antibody. Conversely, ATG5 was co-immunoprecipitated with NS5B when the same extract was incubated with monoclonal anti-c-myc antibody. Indeed, a distinct immunoreactive band (lane 5) that corresponds to the size of ATG5 (lane 7) was detected. However, this band could not be immunoprecipitated by the monoclonal anti-5A antibody (lane 6). This protein-protein interaction was further substantiated by the metabolic labeling experiments shown in Fig. 2B in which ATG5 was constitutively expressed and NS5B expression was under a copper-inducible promoter. As expected, when the labeled extracts were immunoprecipitated with monoclonal anti-HA, a prominent band corresponding to the size of ATG5 was detected in yeast extracts under induced (lane 1) and non-induced (lane 2) conditions. However, the band corresponding to NS5B was only detected in lane 1 (induced condition). When the same extracts were immunoprecipitated with monoclonal anti-c-myc antibody, an intense band

corresponding to the size of NS5B was apparent under the induced condition (lane 3). As expected, a band corresponding to the size of ATG5 was also detected in the extracts under the induced condition (lane 3) but not under the non-induced condition (lane 4). Taken together, these observations indicate that ATG5 and NS5B interact.

To map the interaction domains between NS5B and ATG5, N- and C-terminally truncated mutants of both proteins were assessed by a yeast two-hybrid system. For that purpose, the truncated fragments were inserted into a pGBK7 or pGADT7 plasmid. As illustrated in Fig 3, all constructs containing the C-terminal end of the NS5B displayed interaction with ATG5 while truncation of the NS5B C-terminus completely abrogated such interaction. To confirm the data obtained by yeast two-hybrid screening, co-IP of the putative interacting domains was performed. Both techniques were able to identify the C-terminal end (aa 450-570) of NS5B as the interacting domain for ATG5 (Fig. 3). The NS5B may have several amino acids involved in this interaction since the fragments 1-501, 500-535 and 536-570 independently interacted with ATG5. Thus, the binding domain of NS5B to ATG5 corresponds to the back surface of the thumb domain which has been proposed to be a premium site for protein-protein interaction due to the presence of a highly conserved patch of basic amino acids (Bressanelli et al., 1999).

ATG5 is localized to the membranous web

The interaction observed between ATG5 and the HCV NS5B RdRp suggests that ATG5 might be involved in HCV replication. In cells replicating HCV RNA, NS5B has been localized to the membranous web (Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003). Therefore, we analyzed the localization of ATG5 and NS4B (a well recognized marker of the membranous web) in genome-length C5B replicon cells (Aligo et al., 2009; Konan et al., 2003). The results presented in Fig. 4A indicate that NS4B indeed co-localized with the endogenous ATG5 protein. It is known that ATG5 and its conjugated form, ATG5-APG12, are mostly cytoplasmic in mouse embryonic stem cells but that their association with the membrane increases upon starvation (Mizushima et al., 2001). Thus, we looked at the subcellular membrane association of ATG5 in replicon cells. As expected, both NS5B and ATG5 proteins were excluded from the cytoplasmic fraction (Fig. 4B). Indeed, both proteins appeared to reside in the microsomal/mitochondrial fractions, suggesting that ATG5 is directed to membranes in replicon cells. Note that the nuclear fractions contain both proteins most likely through contamination from the single-step purification protocol of the nuclear fraction.

ATG5 transiently interacts with NS5B during HCV infection

Previously, we and others have unsuccessfully attempted to identify a HCV protein involved in the modulation of the autophagic response that occurs upon HCV infection (Ait-Goughoulte et al., 2008; Dreux et al., 2009). It has recently been suggested that

autophagy is required only early in infection (Dreux et al., 2009). Therefore, we evaluated the co-localization of ATG5 and NS5B in infected Huh7 cells at 2 days post-infection (2 d.p.i.). The selection of 2 d.p.i., as our earliest time point, was based on the slow replication of JFH1 in Huh7 cells for the first few days of infection (Wakita et al., 2005a; Zhong et al., 2005a). Indeed, at 1 d.p.i., HCV core, NS5B and NS5A was undetectable by immunofluorescence staining (data not shown). Therefore, infected Huh7 cells were transfected with pEGFP-ATG5 and analyzed at 2 or 5 d.p.i. for the presence of NS5B and ATG5 (Fig. 5A). To our surprise, strong co-localization of GFP-ATG5 and NS5B was evident in approximately 80% of infected cells at 2 d.p.i., but completely disappear at 5 d.p.i. This result suggests that ATG5-NS5B interaction occurs only during the initial onset of HCV replication and may explain why this interaction has not been detected previously.

ATG5 silencing inhibits HCV replication

ATG5 silencing is known to disrupt autophagy (Matsushita et al., 2007; Mizushima et al., 2001). Thus, we used ATG5 siRNA to evaluate the importance of ATG5-NS5B interaction on HCV replication. As controls, a scramble siRNA was used. The results indicate that silencing ATG5 up to 2 d.p.i. results in undetectable HCV core protein (Fig. 5B) and in a marked reduction in intracellular viral replication as observed by qRT-PCR (Fig. 5C). These results suggest that ATG5 is required for proper viral replication and this requirement is likely through ATG5-NS5B interaction.

Discussion

Recent reports suggest a role for autophagic proteins in HCV replication and/or secretion (Ait-Goughoulte et al., 2008; Dreux and Chisari, 2009; Dreux et al., 2009; Tanida et al., 2009). However, these reports are conflicting and no consensus has yet been reached. Here we provide for the first time a link between a HCV protein, NS5B, and the autophagy machinery. The specific interaction observed between ATG5 and NS5B was through the thumb domain of the polymerase, a region with numerous basic amino acids that could favor protein-protein interaction.

Using Huh7 cells harboring HCV replicon, we showed that ATG5 is associated with the membrane and co-localizes with the membranous web constituent, NS4B. We then used HCVcc to better define the subcellular distribution of ATG5 and NS5B during the course of viral replication. Interestingly, strong co-localization between the two proteins was only seen early in infection and was completely absent late in infection (Fig. 5A). This result may imply that the ATG5-NS5B interaction is required for the onset of the viral replication. Since the primary known function of ATG5 is the formation of the crescent shape DMV, one could argue that HCV requires membrane import during the early stages of viral infection. Indeed, ATG5 is involved in other positive-strand RNA virus replication, probably through the formation of DMV (Khakpoor et al., 2009; Lee et al., 2008a; Prentice et al., 2004). However, we were unsuccessful in visualizing these crescent shaped vesicles or autophagosomes in HCV-infected cells.

Even though unconjugated ATG5 can be found on the crescent-shape autophagosome precursor (Mizushima et al., 2001), maturation into the autophagosome requires the conjugate ATG5-APG12 as well as a series of specific interactions with autophagy proteins (George et al., 2000; Kim, Huang, and Klionsky, 2001; Mizushima et al., 2001). Because viruses such as MHV and perhaps HCV may utilize ATG5 to initiate DMV formation but may not require further maturation of the DMV into autophagosomes, the function of APG12 in virus-induced DMVs remains to be determined.

Replicase proteins of positive-stranded RNA viruses are localized in virus-induced membrane vesicles. In HCV replicon-harboring cells, a membranous structure that contains both viral proteins and RNA, called the membranous web, has been identified (Moradpour et al., 2003). It has been shown that the formation of the membranous web can be induced by NS4B alone (Konan et al., 2003). Another report has shown physical interaction between NS5B (or NS5A) and the SNARE-like protein, hVAP-33 (Tu et al., 1999), leading to the localization of the HCV replicase complex on lipid rafts (Aizaki et al., 2006; Gao et al., 2004b). Despite these findings, the role of the host factors in the formation and function of the HCV replication complex needs to be better defined. In that regard, we propose that autophagic proteins, and perhaps the resulting membranes, are indispensable during the onset of HCV replication.

Materials and methods

Yeast two-hybrid screening

Yeast strains for yeast two-hybrid screening were obtained from Clontech (Mountain View, CA, USA) as components of the pretransformed MATCHMAKER cDNA libraries and the MATCHMAKER Two-Hybrid System 3. *Saccharomyces cerevisiae* Y187 (MAT α), which contained the pretransformed human cDNA library (complexity > 2-4 x 10⁶ independent clones) cloned into the Gal4 activation domain vector (pACT2) was allowed to mate with *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (MAT α), which had been transformed with a Gal4 DNA-binding domain vector (pGBKT7) containing HCV NS5B as a bait. To construct the bait, the HCV NS5B gene lacking the region encoding the C-terminal 21 amino acid residues was amplified by PCR using the HCV-BK (genotype 1b) genomic cDNA as a template and NS5B-H1 and NS5B-R1700 as primers (Table I). The resulting NS5B Δ 21 gene containing unique EcoRI and BamHI sites at the N- and C-termini, respectively, was cloned into the pGBKT7 expression plasmid to generate an in-frame fusion protein with a Gal4 DNA binding domain. The resulting plasmid, pGBKT7-5B Δ 21 was sequenced and subsequently used to transform the AH109 yeast strain. Following mating, the diploid yeast strain (Y187-AH109-NS5B) was selected on SD medium in the absence of leucine, tryptophan and histidine (-LTH). Eight hundred potential positive yeast clones were obtained from two million screenable clones and were replica-plated onto X- α Gal indicator plates in the absence of leucine, tryptophan, histidine and adenine. Three hundred blue colonies (positive for X- α Gal as a result of MEL1 gene activation) were selected by prototrophy for histidine and adenine. These

clones were retested for positive interaction and pACT2/cDNA plasmids were isolated from twenty strong positive clones as reflected by the intensity of the blue color formed on X- α Gal indicator plates. These plasmids were retransformed into yeast strains carrying the bait construct, pGBKT7-5B Δ 21 or pGBKT7, to confirm true interactions. Clones that gave a positive signal when cotransformed with pGBKT7-5B Δ 21 were chosen for DNA sequencing. The DNA sequences of the positive pACT2/cDNA clones were translated and compared with a nonredundant sequence database using the BLAST program through the National Center for Biotechnology Information network service. CLUSTAL_X program was used to analyze statistically significant matches.

Full-length hAPG5-NS5B Δ 21 interaction by yeast two-hybrid assay

In order to obtain the full-length coding region of the hATG5 gene (825 bp), the primers ATG5-H1 and ATG5-R800 (Table I) were prepared for PCR amplification using a human liver cDNA library (Clontech) as a template. PCR products with unique NdeI and BamHI at the N- and C-termini respectively were cloned into the pGADT7 vector. The sequence of the resulting plasmid was confirmed by DNA sequencing. The integrity of the hATG5 and NS5B Δ 21 genes inserted into the yeast plasmids (pGBKT7 and pGADT7) was confirmed *in vitro* by expressing the two proteins using the TNT® T7 Coupled Reticulocite Lysate System (Promega; Madison, WI, USA) as described by the manufacturer. Final confirmation of hAPG5/NS5B Δ 21 interactions by yeast two-hybrid experiments in AH109 cells was carried out as described previously.

Co-immunoprecipitation (Co-IP)

For co-IP, N-terminal tag HA-hAPG5 and c-myc-NS5B Δ 21 proteins were expressed in the BJ2168 yeast strain. Briefly, the hAPG5 and NS5B Δ 21 genes were amplified using the Tag-HA/APG5-R800-Trp and Tag-MYC/NS5B-R1700-Leu primer sets respectively (Table I). The PCR products were then cloned into the YEpc (NS5B) and YEpTDH (hAPG5) plasmids using unique restriction sites (Table I). The resulting expression plasmids, YEpc-NS5B Δ 21 (copper-inducible) and YEpTDH-hAPG5, were used to transform a protease-deficient yeast strain (BJ2168). The double transformant yeast strain, YEpc-NS5B Δ 21/YEpTDH-hAPG5 was grown in SD medium depleted of tryptophan and leucine (-LT). For the induction of c-myc-NS5B Δ 21, cupric sulfate (1 μ M) was added to the -LT medium and incubated overnight at 30 °C.

Yeast extracts containing soluble hAPG5 and NS5B Δ 21 proteins were prepared according to the protocol of Mizushima et al. (2001). Briefly, yeast cells were washed and resuspended in ice-cold TES buffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA and 150 mM NaCl, pH: 7.5). Yeast cell walls were disrupted with acid-washed glass beads by vortexing vigorously for 10 minutes. After centrifugation at 3000 x g for 5 minutes, the supernatant (cytoplasmic and microsomal fractions) was mixed with 0.1 volume of 10% NP40 and incubated for 15 minutes prior to centrifugation at 10,000 x g for 15 minutes. Aliquots of the resulting supernatant (500-600 μ g protein) were incubated with or without 1 μ l of monoclonal anti-Myc antibody (9E10: Santa Cruz, CA, USA) or anti-HA antibody (F6:

Santa Cruz) for 2 hours. A protein A/G sepharose bead mixture (Pierce, Rockford, IL, USA) (10 µl) was added and samples were incubated for an additional 2 hours. The sepharose beads were washed three times with TES buffer and the bound proteins were eluted with 30 µl of Laemmeli buffer. Samples (20 µl) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Proteins were detected by monoclonal anti-c-Myc (9E10) or anti-HA (F2) and visualized by enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham Pharmacia Biotech; Baie d'Urfé, QC, Canada).

Alternatively, co-IP was performed using metabolically labeled cell extract. In brief, BJ2168 yeast cells carrying the YE_p_c-NS5BΔ21 and YE_pTDH-hAPG5 plasmids were grown in SD (-LT) medium overnight at 30°C. When the cells reached mid-log phase, they were washed and incubated for 1 hour in SD (-LT) medium depleted in methionine. Subsequently, 10 µM of cupric sulfate and ³⁵S-labeled methionine (50 µCi) were added to the culture, and incubated for 3 hours. After washing the cells twice with SD medium, yeast extracts were prepared for co-IP study as described previously. Immunoprecipitated proteins were separated on SDS-PAGE followed by autoradiography. The negative control included yeast extracts prepared from the yeast strain without cupric sulfate induction (i.e. expressing only HA-hAPG5), and subjected to the same analysis.

Mapping of hAPG5-NS5BΔ21 interaction domain

Deletion mutants of NS5BΔ21 were generated by PCR using the primers indicated in Table S1. PCR fragments were inserted in pGBKT7 or pGADT7 and the interactions were analyzed by yeast two-hybrid assay. To identify the interaction domains, we performed co-IP of the deletion mutants expressed in the BJ2168 yeast strain using the YEpc and YEpTDH plasmids.

Preparation of viral stock and infection

JFH-1 virus was generated in Huh7 cells by transfection of *in vitro* transcribed full-length JFH1 RNA (MEGAscript, Ambion, Streetville, ON, Canada) and viral stocks were produced by infection of Huh7 cells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01, as described previously (Guevin, Lamarre, and Labonte, 2009).

Subcellular fractionation analysis

For subcellular fractionation, the hAPG5 gene was cloned into the pEGFP-C1 plasmid (Clontech). The resulting pEGFP-hAPG5 plasmid was then transfected into Clone-A and naïve Huh7 cells using lipofectamine as suggested by the manufacturer (Invitrogen; Burlington, ON, Canada). The engineering and characterization of the clone-A cells, which constitutively expressed the HCV nonstructural proteins (NS3, 4A, 4B, 5A and 5B), have been reported elsewhere (Howe et al., 2006). At 48 h post-transfection, cells were trypsinized and washed twice with PBS. After washing, 2×10^7 cells were homogenized in a hypotonic buffer containing 10 mM Tris-HCL, pH 7.5, and 2 mM MgCl₂, followed by centrifugation at 1000 x g for 5 min to yield the nuclear fraction. The

supernatant was then centrifuged at 14,000 x g for 40 min to pellet the microsomal/mitochondrial (mit/mic) fraction. The nuclear and the mit/mic pellets were resuspended in the same volume as the final supernatant using the hypotonic buffer and 20 µl of each extract were resolved on SDS-PAGE and immunoblotting using either a rabbit polyclonal antiserum directed against the HCV NS5BΔ21 or a mouse monoclonal anti-GFP (GFP-20: Sigma). Proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham Pharmacia Biotech).

Indirect immunofluorescence

For indirect immunofluorescence, cells were transfected with the pEGFP-hATG5 and infected with HCVcc JFH1 at a MOI of 0.01. At 24 h post-transfection, the cells were trypsinized and grown on glass coverslips for another 24 h. The coverslips were then fixed in PBS containing 4% formaldehyde for 10 min, washed three times in PBS and incubated for 1 h at 4 °C in blocking buffer (PBS, 3% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100). After three washes in PBS, the coverslips were incubated with a rabbit polyclonal antibody directed against the HCV NS5B protein (generously provided by Dr Takaji Wakita, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) (dilution:1/200) in blocking buffer for 1 h at room temperature (RT). The coverslips were then washed three times in PBS and incubated for 1 h at RT with Alexa fluor 488 or 568 conjugated secondary antibody goat anti-mouse or anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) (dilution :1:500). Coverslips were washed four times in PBS and mounted on glass slides with Prolong™ Antifade (Molecular Probe) and cells were examined with a laser scanning confocal BioRad Radiance 2000 microscope.

SiRNA transfection

SiRNA duplexes targeting human were purchased from Ambion (siRNA ATG5 # AM16708A and scramble siRNA #4611G). SiRNA duplexes (150 pmol) were transfected into 1×10^5 Huh7 cells using the RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen) and infected 6 hour later with HCV JFH-1. Protein knockdown was usually analyzed 48h post-transfection.

Western Blot analysis

Cells were washed three times in phosphate-buffered saline and lysed in RIPA buffer (50 mm Tris/HCl, pH 8.0, 1% (v/v) Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mm NaCl and 0.1% (v/v) SDS) with a Complete Protease Inhibitor Mixture (Roche Applied Science). After SDS-PAGE electrophoresis, protein samples were 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% skimmed milk and the membrane was stained for 1h with the primary antibodies. The antibodies used were HCV polyclonal anti-core (obtained from Dr Denis Leclerc, Laval University, Canada) (dilution: 1/1000) and anti-ATG5 (FL-275) polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (dilution: 1/1000). After incubation with the primary antibody, the membranes were washed four times in PBS-0.1% Tween-20. Bound antibodies were detected by incubation for 45 min with a goat anti-rabbit HRP antibody, Jackson Immunoresearch)

(dilution: 1/10000). The signals were developed with SuperSignal™ West Pico chemiluminescent substrate (Pierce).

Quantitative RT-PCR

Total cellular RNA was prepared from siRNA-transfected cells by using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN). The cDNA were prepared from 250 ng of total cellular RNA. Briefly, RNAs were incubated 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 cDNA were diluted to a final volume of 200 µl with Rnase-free water. Primers used for amplification were: 5'UTR-R: 5'-GAGTGGGTTA TCCAAGAAAG-3' and 5'UTR-F: 5'-TCTGCGGAACCGGTGAGT-3'. The mixture consists of 2.5 µl of cDNA in a final volume of 25 µl of the reaction mixture containing 8.6 µl H₂O, 0.5 µl of probe FAM-UTR (12.5 µM) CCGGAATTGCCGGGAAGACTG, 0.25 µl (90 µM) of each HCV primers. For the 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).

Figure legends

Fig. 1. The NS5B Δ 21 protein interacts with the full-length human ATG5 in yeast two-hybrid assay. NS5B and ATG5 fused to the Gal4 DNA binding and activation domains, respectively, were double-transformed into AH109 cells. Four independent colonies of recombinant AH109 cells were allowed to grow for a few days on –Leu, –Trp SD medium (left panel), after which they were replica-plated onto –Leu, –Trp, –His, –Ade + X- α gal plates (right panel).

Fig. 2. Specific interaction of HCV NS5B Δ 21 protein with ATG5 as observed by co-IP.
A. Soluble yeast extracts containing NS5B Δ 21 (N-terminal c-myc tag) and ATG5 (N-terminal HA tag) were incubated with different monoclonal antibodies and the immunoprecipitates were pulled-down using protein A/G beads. Precipitated proteins were revealed by western blot using anti-c-myc (left panel) or anti-HA (right panel) monoclonal antibodies. Note that IP of ATG5 using anti-HA monoclonal antibody co-precipitated NS5B Δ 21 (lane 2). Anti-HCV NS5A (lane 1) or no antibody (beads only, lane 3) did not precipitate NS5B Δ 21. Soluble extract loaded on the gel was used as the size marker for NS5B Δ 21. IP of NS5B Δ 21 using anti-c-myc antibody precipitated ATG5 (lane 5) but not anti-HCV NS5A antibody (lane 6). Soluble extract loaded on the gel was used as the size marker for ATG5 (lane 7). B. Soluble [35 S]Met-labeled protein extract was immunoprecipitated using anti-HA (lanes 1 and 2) or anti-c-myc (lanes 3 and 4). Extracts were incubated in the presence (lanes 1 and 3) or absence (lanes 2 and 4) of

cupric sulfate, which induced NS5BΔ21 expression. Precipitated bands were analyzed by SDS-PAGE followed by autoradiography.

Fig. 3. Mapping of the NS5BΔ21 and ATG5 binding domains. Results are indicated in the column on the right and were obtained by yeast two-hybrid assay (first two columns) or by co-IP (third column). A. Deletion mutants of NS5B were assessed for interaction with full-length ATG5. The binding area covered the N-terminal amino acids 450-570 as indicated by yeast two-hybrid assay and co-IP. Note that none of the deletion mutants of NS5BΔ21 self-activated in the yeast two-hybrid screen, as shown in the second column, nd indicates not done.

Fig. 4. A. Huh7 and C5B cells were grown for 48 h and co-stained with antibodies specific to ATG5 and NS4B protein. All samples were examined via confocal microscopy. Magnified areas (a) are indicated by rectangles. Notice the co-localization of NS4B with ATG5 in C5B cells. B. Subcellular fractionation of clone-A cells (subgenomic replicon) transfected with GFP-ATG5. Proteins were resolved on SDS-PAGE and visualized by western blot using a polyclonal rabbit anti-NS5B (left) or a monoclonal anti-GFP (right). N, nucleus; C, cytoplasm; M/M, microsome and mitochondria.

Fig. 5. A. Subcellular distribution of NS5B and ATG5 in HCVcc infected cells. JFH1-infected Huh7 cells were transfected with the GFP-ATG5 DNA construct and analyzed at 2 or 5 d.p.i. Co-localization of ATG5 and NS5B was observed at 2 d.p.i. (magnified area in b) but not at 5 d.p.i. (magnified area in c). B. Silencing ATG5 reduced viral replication in Huh7 cells. Huh7 cells were transfected with siRNA targeting ATG5 or with a scramble siRNA as control. The cells were then infected for 2 days and analyzed for the presence of HCV core protein by western blot. As expected, scramble siRNA had no effect on HCV replication whereas ATG5 greatly reduced HCV protein expression. C. Quantification of intracellular HCV genome from samples in panel B. Mock, mock infected cells.

Acknowledgments

We are grateful to Takaji Wakita and Denis Leclerc for Reagents and Nathalie Fournier for technical assistance. This work was supported by NSERC of Canada (grants #312225-05). C. G. and C. B. were supported by a fellowship from the Armand-Frappier Foundation (Canada).

References

- Ait-Goughoulte, M., Kanda, T., Meyer, K., Ryerse, J. S., Ray, R. B., and Ray, R. (2008). Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J Virol* **82**(5), 2241-9.
- Aizaki, H., Choi, K. S., Liu, M., Li, Y. J., and Lai, M. M. (2006). Polypyrimidine-tract-binding protein is a component of the HCV RNA replication complex and necessary for RNA synthesis. *J Biomed Sci* **13**(4), 469-80.
- Aligo, J., Jia, S., Manna, D., and Konan, K. V. (2009). Formation and function of hepatitis C virus replication complexes require residues in the carboxy-terminal domain of NS4B protein. *Virology* **393**(1), 68-83.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F. A. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23), 13034-9.
- Dreux, M., and Chisari, F. V. (2009). Autophagy proteins promote hepatitis C virus replication. *Autophagy* **5**(8), 1224-5.
- Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S. F., and Chisari, F. V. (2009). The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(33), 14046-51.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**(12), 5974-84.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J. W., and Lai, M. M. (2004). Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* **78**(7), 3480-8.
- George, M. D., Baba, M., Scott, S. V., Mizushima, N., Garrison, B. S., Ohsumi, Y., and Klionsky, D. J. (2000). Apg5p Functions in the Sequestration Step in the Cytoplasm-to-Vacuole Targeting and Macroautophagy Pathways. *Mol. Biol. Cell* **11**(3), 969-982.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* **77**(9), 5487-92.

- Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K., and Baker, S. C. (2002). RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J Virol* **76**(8), 3697-708.
- Guevin, C., Lamarre, A., and Labonte, P. (2009). Novel HCV replication mouse model using human hepatocellular carcinoma xenografts. *Antiviral Res* **84**(1), 14-22.
- Hammond, E. M., Brunet, C. L., Johnson, G. D., Parkhill, J., Milner, A. E., Brady, G., Gregory, C. D., and Grand, R. J. A. (1998). Homology between a human apoptosis specific protein and the product of APG5, a gene involved in autophagy in yeast. *FEBS Letters* **425**(3), 391-395.
- Howe, A. Y., Cheng, H., Thompson, I., Chunduru, S. K., Herrmann, S., O'Connell, J., Agarwal, A., Chopra, R., and Del Vecchio, A. M. (2006). Molecular mechanism of a thumb domain hepatitis C virus nonnucleoside RNA-dependent RNA polymerase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(12), 4103-13.
- Khakpoor, A., Panyasrivanit, M., Wikan, N., and Smith, D. R. (2009). A role for autophagolysosomes in dengue virus 3 production in HepG2 cells. *J Gen Virol* **90**(Pt 5), 1093-103.
- Kim, J., Huang, W. P., and Klionsky, D. J. (2001). Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. *J Cell Biol* **152**(1), 51-64.
- Kim, J., and Klionsky, D. J. (2000). Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* **69**, 303-42.
- Klionsky, D. J., and Emr, S. D. (2000). Cell biology - Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**(5497), 1717-1721.
- Konan, K. V., Giddings, T. H., Jr., Ikeda, M., Li, K., Lemon, S. M., and Kirkegaard, K. (2003). Nonstructural protein precursor NS4A/B from hepatitis C virus alters function and ultrastructure of host secretory apparatus. *J Virol* **77**(14), 7843-55.
- Kyono, K., Miyashiro, M., and Taguchi, I. (2002). Human eukaryotic initiation factor 4AI associates with hepatitis C virus NS5B protein in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **292**(3), 659-66.
- Lee, Y. R., Lei, H. Y., Liu, M. T., Wang, J. R., Chen, S. H., Jiang-Shieh, Y. F., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Liu, C. C., and Liu, H. S. (2008). Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology* **374**(2), 240-248.

- Matsushita, M., Suzuki, N. N., Obara, K., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2007). Structure of Atg5/Atg16, a complex essential for autophagy. *J Biol Chem* **282**(9), 6763-72.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology* **9**(9), 1089-U74.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**(6700), 395-8.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* **152**(4), 657-68.
- Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H. E., and Bienz, K. (2003). Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res* **60**(2), 103-9.
- Pedersen, K. W., van der Meer, Y., Roos, N., and Snijder, E. J. (1999). Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *Journal of Virology* **73**(3), 2016-2026.
- Prentice, E., Jerome, W. G., Yoshimori, T., Mizushima, N., and Denison, M. R. (2004). Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **279**(11), 10136-10141.
- Schlegel, A., Giddings, T. H., Jr., Ladinsky, M. S., and Kirkegaard, K. (1996). Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* **70**(10), 6576-88.
- Suhy, D. A., Giddings, T. H., and Kirkegaard, K. (2000). Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *Journal of Virology* **74**(19), 8953-8965.
- Tanida, I., Fukasawa, M., Ueno, T., Kominami, E., Wakita, T., and Hanada, K. (2009). Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy* **5**(7), 937-45.

- Tu, H., Gao, L., Shi, S. T., Taylor, D. R., Yang, T., Mircheff, A. K., Wen, Y., Gorbalenya, A. E., Hwang, S. B., and Lai, M. M. (1999). Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* **263**(1), 30-41.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., and Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**(7), 791-6.
- Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B. M., and Luo, H. (2008). Autophagosome Supports Coxsackievirus B3 Replication in Host Cells. *Journal of Virology* **82**(18), 9143-9153.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T., and Chisari, F. V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(26), 9294-9.

Figures

Figure 1

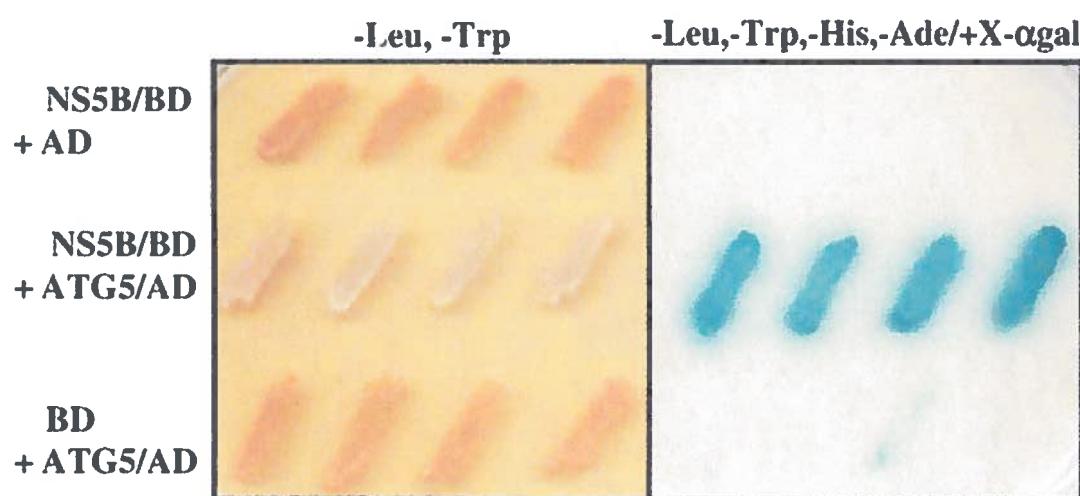


Figure 2

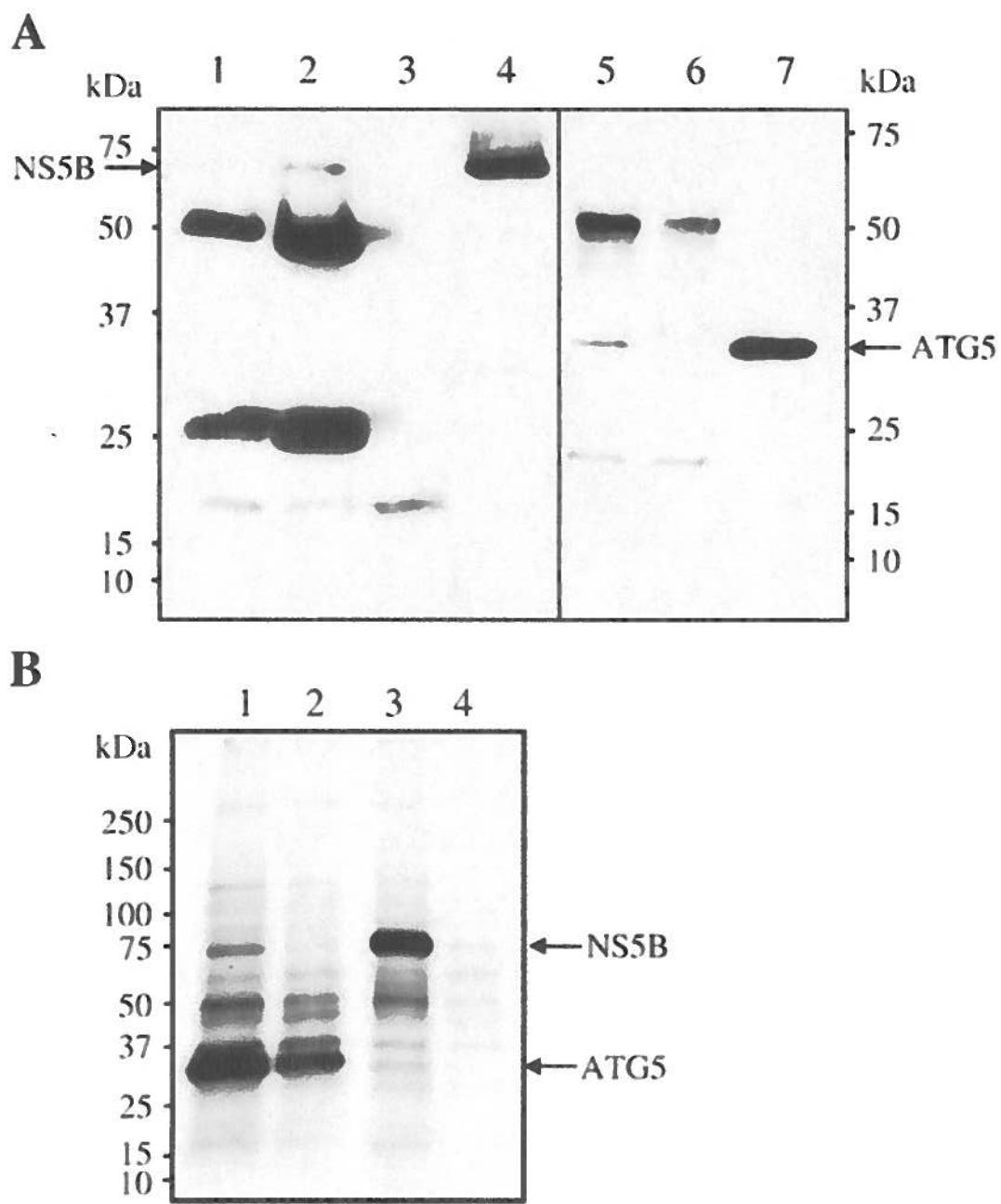


Figure 3

		NS5B/ ATG5	NS5B/ AD	Co-IP
46	Fingers			
139				
287	Palm			
371	Thumb			
529				
570		+	-	+
591		+	-	+
		nd	nd	-
570				
501				
450				
403				
304				
104				
99				
199				
298				
399				
500				
500				
535				
536				

Figure 4

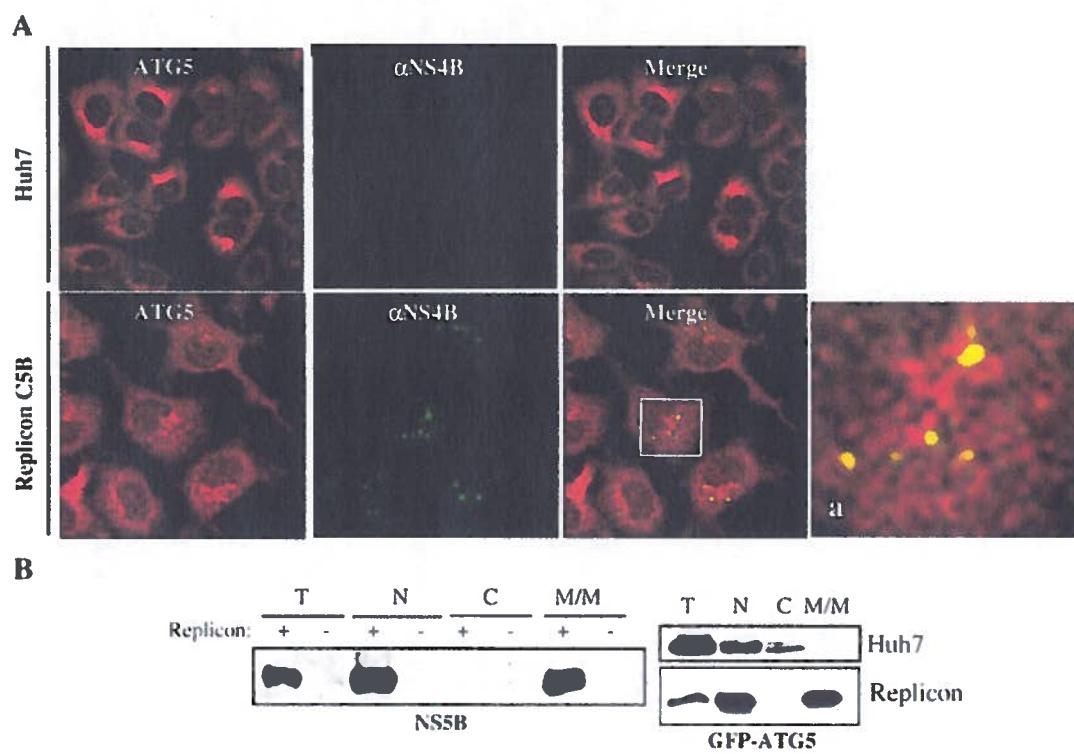
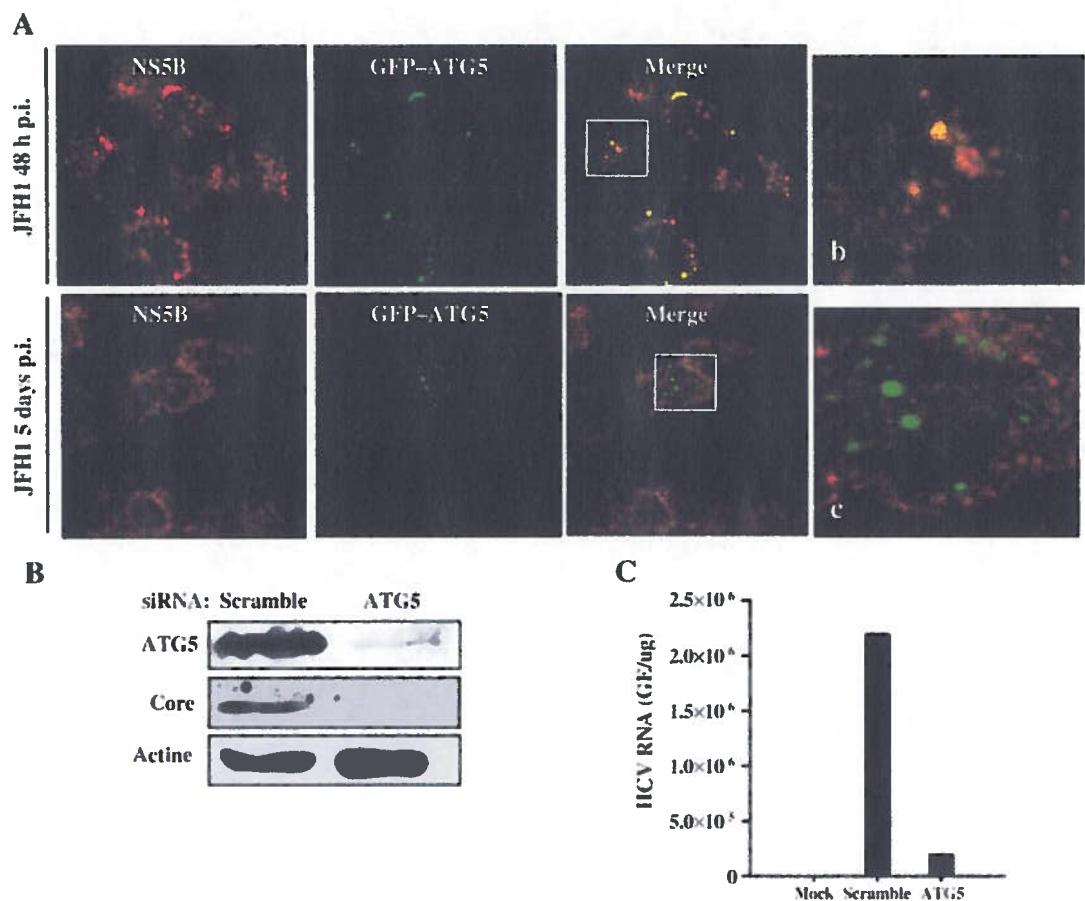


Figure 5



CHAPITRE 4 : DISCUSSION

9 Discussion

Actuellement, il n'existe aucun vaccin contre le VHC et le traitement actuel (interféron et ribavirine) est dispendieux, peu efficace et mal toléré chez les patients. Les modèles animaux sont essentiels afin d'évaluer l'efficacité des agents antiviraux, de développer de meilleures stratégies thérapeutiques, ainsi que pour garantir l'éthique et la sécurité des essais cliniques. L'absence d'un modèle animal simple et reproductible constitue donc un obstacle majeur dans l'étude du cycle viral du VHC *in vivo*.

Actuellement, la majorité des molécules anti-VHC faisant l'objet d'essais cliniques chez les patients ont été sélectionnées sur la démonstration de leur efficacité lors d'essais cellulaires *in vitro*, combinée à une connaissance de la pharmacocinétique et de l'innocuité du médicament jugée acceptable. Ce processus se fait malencontreusement en absence de données sur l'efficacité *in vivo* des molécules sélectionnées. La difficulté principale est d'estimer avec précision, à partir des données obtenues par les systèmes *in vitro*, l'exposition au médicament permettant d'obtenir un effet thérapeutique chez le patient. Certains modèles théoriques puissants utilisés en pharmacocinétique sont malheureusement limités au niveau de leur validité, c'est-à-dire qu'ils sont beaucoup trop complexes dans un contexte physiopathologique et du même coup ne peuvent prédire l'efficacité d'une drogue dans un organe cible (Meanwell, 2011).

À ce jour, plusieurs limitations restreignent l'utilisation à grande échelle des modèles animaux du VHC développés jusqu'à maintenant. Premièrement, la production d'animaux est limitée en nombre et elle nécessite des habiletés chirurgicales hautement spécialisées, ce qui rend les différents modèles très dispendieux. Deuxièmement, la génération de certains modèles (SCID/Alb-uPA) nécessite l'utilisation d'hépatocytes humains et de sérum VHC⁺ et cet accès est souvent difficile à obtenir. De plus, la précarité et la fragilité des modèles limitent le nombre de molécules pouvant être testées lors des études *in vivo*.

L'objectif principal de mon projet de doctorat était de mettre au point un modèle murin de xénogreffé d'hépatocarcinome humain permettant la réPLICATION du VHC. Le

modèle animal que nous avons développé et qui est décrit dans la première publication scientifique de la thèse, s'avère un modèle simple, peu couteux et accessible. Nous avons montré que notre modèle permet d'évaluer l'efficacité de molécules antivirales contre le VHC de même que d'établir leurs profils pharmacocinétiques *in vivo*. Ainsi, le modèle murin de xénogreffe est un modèle animal très bien adapté à l'industrie pharmaceutique puisqu'il pourrait aisément servir à l'évaluation d'agents d'antiviraux contre le VHC *in vivo*.

Avant d'entreprendre le développement du modèle animal, nous avons mis au point divers outils d'analyses essentiels au projet de thèse et au bon fonctionnement du laboratoire du Dr Labonté. En premier lieu, nous avons reproduit le système de culture cellulaire du VHC JFH1. La mise au point du PCR en temps réel quantitatif (Taqman) nous a permis d'analyser efficacement la réPLICATION de l'ARN du VHC JFH1 transfecté dans les cellules Huh7. Nous observons une réPLICATION virale avec des titres allant jusqu'à 1×10^8 ARN VHC (GE/ug) au-delà de 35 jrs post-électroporation et cette réPLICATION demeure présente après de multiples passages en culture cellulaire (résultats non publiés).

La production de particules virales infectieuses a été mise en évidence en inoculant des cellules saines Huh7 avec le surnageant de culture des cellules transfectées avec l'ARN viral JFH1. L'expression des protéines du VHC (E2, core et NS5A) ont été détectés par immunobuvardage de type western et la quantité d'ARN viral par PCR en temps réel (Taqman) 14 jours après l'infection. La production d'un pool de virus a été effectuée à l'aide de cellules Huh7. Le titre viral du pool a été déterminé par immunofluorescence indirecte sur des cellules Huh7 (1×10^3 cfu/mL).

9.1 Développement et caractérisation d'une lignée hépatocytaire humaine tumorigénique

La première étape du projet de recherche a été de développer une lignée cellulaire hépatocytaire humaine permissive au VHC JFH1 capable de former des carcinomes hépatocellulaires humains *in vivo*. En 2000, le Dr Patrick Labonté a développé un modèle de carcinome hépatocellulaire humain orthotopique implanté chez la souris

nude immunodéficiente (Labonte et al., 2000b). La lignée cellulaire hépatique Huh7, provenant du Dr Masayoshi Namba du Japon, a été utilisée afin de produire un clone homogène tumorigénique nommé HuT7-3. Pour obtenir le clone HuT7-3, le gène codant pour la néomycine fut introduit dans la lignée parentale Huh7 et deux sous-clonages furent effectués par la suite. L'injection des cellules HuT7-3 sous-cutané ou dans le foie (orthotopique) produit des tumeurs solides chez plus de 80% des souris nude. Il est important de noter que les xénogreffes de carcinomes hépatocellulaires humains dans les modèles murins sont encore difficiles à réaliser à ce jour.

Ce modèle fut ensuite utilisé dans un contexte d'infection du VHC *in vivo* (Labonte et al., 2002a). Le modèle animal développé est basé sur l'infection de cellules HuT7-3 *ex vivo* avec un sérum de patient VHC⁺, qui sont par la suite implantées de façon orthotopique dans le foie des souris nude. L'ARN viral du VHC est détectable par RT-PCR semi-quantitatif à de faibles niveaux dans le sérum et dans les tumeurs jusqu'à 42 jours post-infection. Des analyses d'immunohistochimie ont aussi montré la présence de quelques cellules exprimant la protéine NS5B du VHC dans les tumeurs humaines infectées comparativement au groupe non infectée. Malheureusement, cette lignée cellulaire s'est avérée peu permissive aux particules virales provenant de sérum humain infecté. Cependant, l'arrivée du système de production de particules virales infectieuses en culture cellulaire (VHCcc JFH1 génotype 2a) et l'utilisation de la lignée cellulaire Huh7 permissive au VHC JFH1 nous ont permis de surmonter les difficultés citées précédemment.

Dans le but de développer une lignée cellulaire hépatocytaire permissive et tumorigénique, nous avons analysé la permissivité des lignées cellulaires HuT7-3 et Huh7 (lignée parentale) aux VHCcc JFH1 (Figure S1).

Tel que présenté dans la Figure S1, des analyses par qRT-PCR en temps réel (Taqman) sur la présence d'ARN viral intracellulaire montrent que la lignée cellulaire HuT7-3 ne peut être infectée par les VHCcc ou encore transfectée par l'ARN pleine longueur du clone moléculaire JFH1 (résultats non publiés). Il est possible que les cellules HuT7-3 aient perdu un récepteur important (claudine-1, occludine ou scavenger récepteur-1) durant les étapes de sous clonage. Par contre, il a été observé que le

récepteur CD81 est exprimé normalement à la surface des cellules. L'impossibilité d'établir une infection suite à une transfection d'ARN viral JFH1 dans les cellules HuT7-3, nous a mené à émettre l'hypothèse que ce clone parental de la lignée Huh7 aurait perdu un facteur important nécessaire à la réPLICATION du virus. Il a été montré dans la littérature que certaines souches de cellule Huh7, provenant de différents laboratoires, présentent différents niveaux : 1) de permissivité à l'entrée du virus, 2) de réPLICATION de l'ARN intracellulaire et 3) de production de virus infectieux VHCcc JFH1 (Sainz, Barreto, and Uprichard, 2009).

Nous avons décidé de développer une nouvelle lignée cellulaire tumorigénique à partir de la lignée parentale Huh7 pour ce projet de thèse. Cette lignée se devait d'être permissible aux VHCcc JFH1. Afin d'augmenter la nature tumorigénique des Huh7, c'est-à-dire la capacité de produire des tumeurs solides sous-cutanées, nous avons effectué plusieurs passages *ex vivo/in vivo* dans différentes souches de souris immunodéficientes. L'utilisation de souris possédant un système immunitaire déprimé permet d'éviter le rejet des cellules d'hépatocarcinomes humains. Plusieurs facteurs influencent le succès d'implantation des tumeurs humaines. La souche de souris utilisée lors des expériences est sans contredit très importante puisque plus le système immunitaire est déficient, plus l'implantation de la tumeur est facilitée. De ce fait, nous avons testé trois souches de souris immunodéficientes lors des expériences de xénogreffe : la souris CD-1 nude, la souris SCID et la souris SCID/beige (Tableau S1).

Ces trois souches de souris présentent des anomalies au niveau de leur système immunitaire. Les souris CD-1 nude ont une mutation qui affecte le développement de l'épithélium cortical du thymus et l'absence de thymus provoque une déficience en lymphocytes T périphériques dans animal (Flanagan, 1966). Les souris SCID ont plutôt une mutation autosomale récessive nommée Prkdcscid. Cette mutation empêche l'activité recombinase nécessaire aux réarrangements génomiques permettant l'expression des récepteurs spécifiques à l'antigène des lymphocytes T (TCR) et des lymphocytes B (BCR), qui résulte en une immunodéficience sévère. Ces souris possèdent toutefois des cellules NK, des granulocytes et des macrophages tout à fait normaux. Quant à elles, les souris SCID/beige ont les mutations SCID et beige (Lystbg). Ces mutations induisent une

déficiency au niveau des cellules NK, qui jouent un rôle important dans la prévention et l'élimination des cellules cancéreuses. Bien que la souris SCID/beige soit la meilleure candidate, lors des expériences de xénogreffé de tumeur elle demeure fragile et plus susceptible aux infections et aux complications post-chirurgicaux.

Vue leur très bonne capacité à supporter la croissance de xénogreffé tumorale, nous avons utilisé les souris SCID/beige dans le but de développer une lignée cellulaire tumorigénique à partir de la lignée parentale Huh7. Au cours du développement de la lignée cellulaire tumorigénique, nous avons effectué dix passages *ex vivo/in vivo* avec les Huh7. Les passages *ex vivo/in vivo* consistaient à extraire la tumeur d'une souris pour ensuite la fragmenter en petit cubes uniformes qui sont réimplantés de façon sous-cutanée dans un nouveau groupe souris. Lorsque le caractère tumorigénique des tumeurs atteint 80% de taux d'implantation dans les animaux, nous arrêtons les passages dans les animaux et remettons en culture cellulaire la tumeur solide au moyen d'un traitement à la collagénase. Par ce procédé, il est possible de conserver les cellules tumorigéniques ou bien de les multiplier pour de futures expériences *in vivo*.

Suite à l'obtention des cellules tumorigéniques Huh7, nous avons effectué une étude pilote où nous avons infecté, avec les VHCcc JFH1, un groupe de 15 souris SCID/beige portant des tumeurs Huh7 sous-cutanées. À notre grande surprise, après des analyses de qRT-PCR (taqman), aucun ARN viral n'a été détecté dans le sérum des souris infectées de même que dans les tumeurs. Nous sommes venus à la conclusion que ces cellules extrêmement tumorigéniques avaient perdu leur permissivité au virus durant les multiples passages dans les animaux. Nous avons alors répété les expériences en choisissant des cellules Huh7 ayant subi un plus petit nombre de passages dans les souris, c'est-à-dire des cellules possiblement moins tumorigéniques, mais permissives au VHCcc JFH1. Cette lignée cellulaire a été nommée Huh7-7, dû au fait qu'elle a été passée sept fois dans les animaux. Les cellules Huh7-7 se sont avérées permissives au virus *in vivo*, tout en maintenant leur capacité à induire la formation d'hépatocarcinomes humains dans les souris SCID/beige. Il est à noter que la croissance des tumeurs humaines se produit uniquement au site d'injection et n'induit pas la formation de métastase dans l'animal.

Au niveau de l'expression des récepteurs impliqués dans l'entrée du VHC ainsi que le récepteur de la transferrine (TFR), bien connu pour son rôle de captation du fer à la surface des cellules du foie; les Huh7-7 sont identiques à la lignée parentale Huh7 à l'exception du CD81. Nous avons retrouvé deux populations distinctes exprimant ou non le récepteur CD81. Toutefois, bien que seulement 75% de la population de cellules Huh7-7 expriment le CD81, les Huh7-7 sont aussi permissive que les Huh7 au VHC JFH1 lors des infections *in vitro* et *in vivo*. Effectivement, plusieurs équipes de recherche ont montré que l'expression du récepteur CD81 est indispensable à l'entrée cellulaire du virus (Flint et al., 1999; Pileri et al., 1998; Rice, 1999). Il est aussi clairement démontré dans la littérature que l'infection indépendante du CD81 par le VHC peut se produire dans une population cellulaire Huh7 mixte, c'est-à-dire, que le virus peut se répandre avec efficacité d'une cellule exprimant le CD81 à une autre ne l'exprimant pas (Timpe et al., 2008). Nous avons montré que la réplication virale, l'infectiosité spécifique et la densité des particules virales sécrétées dans le surnageant sont identiques dans les deux types cellulaires *in vitro*.

9.2 Virémie et réplication virale du VHC dans le modèle de xénogreffe murin d'hépatocarcinome humain

Dans le but de simplifier l'approche expérimentale et de standardiser nos résultats, nous avons choisi d'implanter dans les souris des cellules Huh7-7 préalablement infectées *in vitro* avec le clone moléculaire VHC JFH1. Pour ce, nous avons vérifié, par des analyses en immunofluorescence, que les cellules Huh7-7 étaient infectées à 100% en culture cellulaire avant de les injecter dans les souris de façon sous-cutanées. Cette méthode assure le développement de tumeurs humaines solides entièrement infectées et permet une évolution rapide de la virémie dans les animaux. Comme deuxième mode d'infection *in vivo*, nous avons été en mesure d'effectuer des infections par voie intratumorale avec les VHCcc JFH1. Cette deuxième approche d'infection dans les animaux portant des tumeurs humaines Huh7-7 naïves s'avère aussi efficace que la première approche où les cellules sont préalablement infectées *in vitro* cependant nous avons noté une légère diminution de la reproductibilité.

Il est connu que le micro-environnement hépatique de l'hôte naturel du VHC favorise la réPLICATION virale. Il a été observé que des transcrits viraux synthétisés à partir de génomes complets du VHC de plusieurs génotypes sont infectieux s'ils sont inoculés dans le foie de primates. Au contraire, ces mêmes transcrits sont dépourvus d'activité réPLICATIVE dans la lignée cellulaire Huh7 *in vitro* (Kolykhalov et al., 1997; Sbardellati et al., 2001; Yanagi et al., 1998). De plus, le VHC se réPILE efficacement chez l'être humain alors que son taux de réPLICATION dans les hépatocytes primaires en culture est faible (Fournier et al., 1998b; Neumann et al., 1998). Dans le cadre de mon projet de thèse, il aurait été intéressant d'implanter les cellules Huh7-7 orthotopiquement dans le foie des souris. Selon l'hypothèSE citée précédemment, ce site d'implantation à proximité du foie murin aurait pour conséquence de favoriser la réPLICATION du virus dans l'hépatocarcinome humain et possiblement d'augmenter la quantité de particules virales sécrétées et/ou l'infectiosité spécifique de celles-ci (le nombre de particules virales nécessaires pour entraîner l'infection d'une cellule, d'un hôte). Curieusement, deux récentes études, utilisant sensiblement le même modèle de xénogreffe d'hépatocarcinome humain dans l'animal, rapportent une diminution de la réPLICATION virale de 1 à 2 log lorsque des cellules Huh7 portant un réPLICON du VHC sont implantées de façon intrahépatique comparativement aux cellules implantées sous-cutanées (Hazari et al., 2011; Zhu et al., 2006b). Les auteurs émettent l'hypothèSE que l'immunité innée du foie pourrait avoir un effet antiviral local en diminuant l'ARN viral du VHC de la tumeur humaine implantée dans l'organe. Toutefois, les réPLICONS subgénomiques (mini-génome) du VHC utilisés dans ces deux études ne reproduisent pas l'infection naturelle du virus puisqu'ils ne sont pas infectieux, contrairement au clone moléculaire JFH1 pleine longueur.

D'autre part, il est intéressant de remarquer que l'ARN viral détecté dans les souris SCID/beige se retrouve en parti dans les fractions légères du gradient de sucre (1.06-1.10 g/mL). En cohérence avec ces résultats, il a été montré que les VHCcc ayant une infectiosité spécifique élevée ont une densité de flottaison de 1.10 g/ml (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005a; Zhong et al., 2005a). Similairement, les isolats cliniques possédant une infectiosité élevée chez les animaux ont une densité de flottaison ≤ 1.09 g/ml, qui serait due à l'association du VHC aux lipoprotéines de basse et de très

basse densité (LDL et VLDL) dans le sérum des souris infectées (Miyamoto et al., 1992). En lien avec ces derniers résultats, le virus récupéré des souris infectées s'est avéré plus infectieux que le virus produit en culture cellulaire dans les Huh7, suggérant que l'association du virus avec les lipoprotéines murines pourrait augmenter l'infectiosité spécifique du virus *in vivo*. Lindenbach *et al.* ont similairement montré que le passage des VHCcc dans les animaux (chimpanzé et souris SCID/Alb-uPA) avait pour effet d'augmenter l'infectiosité spécifique des virions et d'accroître le pourcentage d'ARN du VHC dans la fraction se situant à 1.10 g/mL (Lindenbach et al., 2006). De plus, il a été observé que la capacité des pseudo-particules virales du VHC à entrer dans les cellules Huh7 est augmentée en présence des sérum de chimpanzé ou humain, de lipoprotéines humaines ou d'apolipoprotéines humaines (Bartosch et al., 2005; Lavillette et al., 2005; Meunier et al., 2005). Ainsi, il est possible que les lipoprotéines et les apolipoprotéines puissent elles aussi augmenter l'infectiosité du VHC en culture cellulaire.

Les VHCcc JFH1 que nous avons produites et utilisées dans le modèle murin de xénogreffe d'hépatocarcinome humain appartiennent au génotype 2a. Les VHCcc chimériques possédants la partie structurale des six génotypes pourraient être testées dans le modèle animal. Évidemment, il aurait été intéressant et très utile d'avoir à notre disposition un clone moléculaire pleine longueur du génotype 1 pour le criblage d'antiviraux novateur car ce génotype VHC est plus résistant aux traitements et responsable de 70 % des cas de VHC aux Etats-Unis, au Japon et en Europe occidentale (Kuntzen et al., 2008). Malheureusement, le réplicon pleine longueur issu de la souche Hutchinson (H77s génotype 1a), développé par l'équipe du Dr Lemon, se réplique faiblement dans la lignée cellulaire Huh7 *in vitro* (Yi et al., 2006a). (Bukh et al., 2002)

9.3 Validation du modèle animal

Notre modèle murin de xénogreffe d'hépatocarcinome humain a été validé en utilisant l'interféron α -2b (Intro-A) et l'anti-protéase BILN-2061, deux molécules ayant montré une activité anti-VHC chez les patients (Brass, 1998; Hinrichsen et al., 2004; Lamarre et al., 2003). Nous avons observé une diminution de la virémie du VHC chez les souris traitées avec ces deux molécules comparativement au groupe contrôle traité avec la saline. Ces résultats sont similaires à ceux publiés par les groupes de recherche utilisant le

modèle murin du réplicon VHC, le modèle murin SCID-Alb/uPA ainsi que le modèle murin chimérique FAH (Bissig et al., 2010; Meuleman and Leroux-Roels, 2008; Vanwolleghem et al., 2007; Zhu et al., 2006b). Dans notre modèle, la stabilité de la taille des tumeurs lors de l'administration de l'Intron-A confirme que l'effet antiviral est dû à l'interféron et non pas à l'effet cytotoxique que pourrait engendrer cette drogue sur les tumeurs humaines. Nous avons observé une corrélation tangible entre l'effet anti-VHC des drogues dans le modèle murin de xénogreffe d'hépatocarcinome humain et la réponse antivirale observée chez les patients en traitement (Heathcote et al., 2000; Reiser et al., 2005).

9.4 Perspectives

9.4.1 Étude de l'efficacité antivirale de la protéine PCSK9 *in vivo*

Récemment, une étude pilote, chez les patients VHC⁺ non traités, effectuée par l'équipe du Dr Labonté en collaboration avec Dr Naglaa Shoukry (CHUM) et Dr Nabil G Seidah (IRCM), a montré une corrélation inverse entre la charge virale plasmatique (ARN du VHC) et la quantité de protéine PCSK9 circulante chez les patients infectés par le VHC (Figure S2, résultats non publiés). Tel que cité précédemment (chapitre 3.1), l'absence de PCSK9 circulant chez la souris *Pcsk9*^{-/-} a pour conséquence d'augmenter l'expression du récepteur CD81 au niveau du foie (Labonte et al., 2009) (appendice A). Chez l'humain, il est probable que la concentration de PCSK9 sanguin puisse influencer l'expansion du virus dans le foie en modulant les niveaux d'expression des récepteurs du VHC (LDLR et CD81). Par conséquent, nous croyons que cette protéine endogène circulante (PCSK9) pourrait diminuer la virémie du VHC chez l'humain.

Le modèle murin de réplication du VHC développé dans ce projet de thèse sera utilisé pour évaluer le potentiel antiviral de PCSK9 *in vivo*. À l'aide de vecteurs adénoviraux recombinants, il sera possible d'exprimer la protéine PCSK9 humaine dans le foie et dans les cellules Huh7.7 implantées dans les animaux. Ces adénovirus recombinants proviennent du laboratoire du Dr Nabil Seidah de l'IRCM et ils ont déjà été

utilisés dans des études *in vitro* et *in vivo* par ce groupe de recherche. Plusieurs équipes de recherche ont utilisé l'adénovirus ad-PCSK9 purifié pour étudier l'effet de la proprotéine convertase PCSK9 sur le métabolisme du cholestérol et l'expression du LDLR *in vivo* (Maxweel et al., 2004; Schmidt et al., 2008; Lalanne et al., 2005). Ces ad-PCSK9 recombinants sont des particules virales infectieuses mais incompétentes pour la réplication. La délétion du gène de la protéine E1 et E3, rend le virus incapable de se répliquer (Luo et al., 2007). En ce sens, nous prévoyons analyser l'effet de la surexpression de PCSK9 *in vivo* sur le niveau d'expression endogène des récepteurs du VHC (LDLR et CD81). Les expériences telles que décrites ci-dessus serviront à déterminer l'efficacité de l'adénovirus PCSK9 à inhiber les récepteurs du VHC. Par la suite, nous utiliserons notre modèle animal afin d'évaluer le potentiel antiviral de PCSK9 *in vivo*. La détection de l'ARN du VHC JFH1 lors des cinétiques d'infection sera effectuée par PCR en temps réel (taqman). Dans ce projet, nous sommes présentement à l'étape de finaliser la production et la purification des stocks d'adénovirus PCSK9 et du contrôle témoin adénovirus GFP pour leur utilisation ultérieure *in vivo*. De plus, nous caractérisons actuellement l'effet des adénovirus PCSK9 sur l'expression du CD81 et du LDLR dans la lignée cellulaire Huh7 et Huh7.7 *in vitro* et son effet antiviral contre le VHC. L'utilisation de la protéine PCSK9 dans le but de bloquer l'infection du VHC lors d'une transplantation hépatique où comme thérapie prophylactique post-exposition pourrait s'avérer une avenue thérapeutique très intéressante. De plus, lors d'exposition accidentelle au VHC (sang, sperme, professionnel), la prise d'un traitement avec PCSK9 en urgence pourrait empêcher la transmission et la propagation du virus dans le foie.

9.4.2 Effet de l'inhibition de la protéine autophagique ATG5 sur la réplication du VHC *in vivo*

De récentes études ont montré que le virus de l'hépatite B (VHB) a la capacité d'induire le phénomène de l'autophagie en culture cellulaire (Sir, Ann, and Ou, 2010; Sir et al., 2010). L'équipe du Dr Ou, de l'Université de la Californie du Sud, a étudié l'importance de l'autophagie sur la réplication du VHB *in vivo*. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé un modèle murin transgénique du VHB où le gène ATG5 est supprimé ($ATG5^{-/-}$) et ils rapportent une diminution de 90% des niveaux d'ADN du VHB dans le

sérum des animaux transgéniques. L'ADN intermédiaire répliquant du virus était, lui aussi, devenu quasi indétectable dans le foie des souris ATG5^{-/-} comparativement aux souris contrôles. De plus, la suppression de l'autophagie diminue légèrement l'expression des gènes du VHB et affecte la localisation nucléaire de la protéine core (Tian et al., 2011). Ces résultats montrent l'importance du phénomène de l'autophagie et soulèvent la possibilité qu'elle pourrait servir d'élément proviral pour les virus hépatotropiques comme le VHB et le VHC dans un contexte *in vivo*.

Il est bien connu dans la littérature scientifique que l'inhibition de la protéine ATG5 par un ARN interférence (siARN) supprime le phénomène de l'autophagie (Matsushita et al., 2007). Dans le deuxième article de cette thèse, intitulé « *Autophagy protein ATG5 interacts transiently with HCV NS5B polymerase early during infection* », nous avons utilisé un siARN ATG5 afin d'évaluer l'importance de l'interaction entre ATG5 et la protéine virale NS5B sur la réPLICATION du VHC JFH1 en culture cellulaire. Les résultats d'analyses de qRT-PCR (Taqman) montrent une réDUCTION importante de la réPLICATION intracellulaire du virus en présence du siARN ATG5, ainsi qu'une inhibition quasi complète de l'expression de la protéine virale core 48 heures après l'infection initiale. Ces résultats suggèrent que la protéine autophagique ATG5 est nécessaire au fonctionnement de la réPLICATION du virus, vraisemblablement par le biais de l'interaction ATG5- NS5B *in vitro*.

Pour valider ces résultats d'un point de vue *in vivo*, nous allons utiliser le modèle murin de xénogreffe d'hépatocarcinome humain infecté par le VHC JFH1 pour tester des siARN ATG5 et évaluer l'effet potentiel de l'inhibition d'ATG5 sur la réPLICATION du virus dans l'animal. L'autophagie pourrait être une cible thérapeutique dans le traitement des patients atteints d'infection chronique au VHC.

9.5 Discussion de la deuxième publication : Rôle de la protéine autophagique ATG5 dans la réPLICATION du VHC

Dans le but d'identifier de nouveaux facteurs cellulaires pouvant interagir avec l'ARN polymérase ARN-dépendante virale NS5B du VHC (RdRp), le Dr Labonté a effectué un criblage d'une librairie d'ADNc de foie humain. Quelque temps après,

l'équipe du Dr Labonté a montré qu'il existe un lien étroit entre la protéine NS5B du VHC et la machinerie autophagique (Guevin et al., 2010). Des analyses de « yeast two-hybrid » ont confirmé l'interaction physico-chimique entre ATG5 et NS5B dans des cellules co-exprimant ces protéines. L'interaction a lieu via le domaine du « pouce » de la polymérase, où la nature physico-chimique de cette région riche en acides aminés basiques favorise les interactions protéine-protéine. Ensuite, à l'aide du système du réplicon VHC C5B (génotype 1b), nous avons observé, dans la lignée cellulaire Huh7, que la protéine ATG5 s'associe avec les membranes cellulaires et colocalise avec la protéine virale NS4B, connue pour être associée aux constituants du « membranous web » (Konan et al., 2003).

Ensuite, pour mieux analyser la distribution sous-cellulaire des protéines ATG5 et NS5B durant l'infection, nous avons utilisé le système des VHCcc JFH1. Nous observons une localisation entre les deux protéines au début de l'infection seulement. Ce résultat peut signifier que l'interaction ATG5-NS5B est requise pour enclencher la réPLICATION virale uniquement. De nombreuses études montrent l'importance des protéines autophagiques dans la réPLICATION du VHC (Chu et al., 2011; Dreux and Chisari, 2011). Il est bien établi que la protéine autophagique ATG5 est impliquée dans la formation des croissants membranaires des vésicules à double membranes (DMV) et il est possible que le VHC puisse importer ces membranes au stade primaire de l'infection. Plusieurs études ont montré l'implication de la protéine ATG5 dans la réPLICATION virale de nombreux virus à ARN et ce possiblement par l'entremise de la formation de DMV (Khakpoor et al., 2009; Lee et al., 2008b). L'interaction observé entre les protéines ATG5 et NS5B semble suggérer que les protéines autophagiennes pourraient jouer un rôle additionnel dans un contexte autre que l'autophagie. Récemment, il a été montré que le VHB, un virus à ADN, peut augmenter le flux autophagique dans les cellules Huh7 lorsque celles-ci sont infectées. Cette augmentation de la réponse autophagique serait dépendante de la protéine HBx du virus. Les analyses de cette étude montrent que l'autophagie favoriserait la réPLICATION du VHB avec une implication minimale des vacuoles autophagiques tardives (Sir et al., 2010).

Certains virus à ARN, comme le MHV et probablement le VHC, utiliseraient ATG5 pour initier la formation de DMV, sans avoir besoin de la phase de maturation des vésicules en autophagosomes, dans le but d'initier la réPLICATION virale. Effectivement, la maturation en autophagosome requiert la conjugaison des protéines ATG5 et ATG12, ainsi qu'une série d'interactions avec d'autres protéines autophagiques. Jusqu'ici, personne ne connaît la fonction de la protéine ATG12 au niveau de l'induction des DMV par le VHC et ce dernier point est à investiguer. De façon générale, les molécules conjuguées ATG5-ATG12 forment un complexe avec la protéine autophagiique ATG16 de manière constitutive, plus précisément durant la formation de l'autophagosome (Matsushita et al., 2007). Des résultats préliminaires réalisés dans notre laboratoire montrent une localisation de la protéine autophagiique ATG16 avec plusieurs protéines non structurales du VHC (manuscrit en préparation). De plus, les analyses de microscopie électronique à transmission d'une récente étude ont montré la présence de nombreuses vésicules à doubles membranes dans la lignée cellulaire Huh7.5 porteuse du réplicon sous-génomique VHC JFH1 en comparaison aux cellules naïves. L'homogénéisation et l'ultracentrifugation sur des gradients de sucre d'extraits cellulaires contenant le réplicon montre la présence des protéines virales NS3 et NS5A, de l'ARN du VHC, ainsi que de la protéine LC3-II, un marqueur spécifique des membranes autophagiiques, dans les fractions de densité entre 1.18 et 1.27 g cm⁻³ (Ferraris, Blanchard, and Roingeard, 2010).

Les protéines impliquées lors de l'étape de la réPLICATION des virus à ARN de polarité positive sont reconnues comme étant localisées dans des vésicules membranaires dont la formation est induite par les virus eux même. Par ailleurs, il a été montré que la réPLICATION de réplicons sous-génomiques du VHC dans la lignée cellulaire Huh7 induit d'importantes réorganisations membranaires conduisant à la formation de réseaux vésiculaires appelés « membranous web ». À l'intérieur de cette intrigante structure, les auteurs ont identifié des protéines virales ainsi que l'ARN du VHC, indiquant bien la présence du complexe de réPLICATION du virus (Moradpour et al., 2003). De plus, il a été montré que la protéine virale NS4B pouvait à elle seule induire la formation de « membranous web » dans les cellules Huh7 (Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003; Konan et al., 2003). Pour mieux étudier les facteurs de l'hôte impliqués dans la

réPLICATION DU VHC, L'ÉQUIPE DU DR BARTENSLAGER A EFFECTUÉ UN CIBLAGE DU KINOME HUMAIN PAR L'APPROCHE siRNA. ILS ONT DÉCOUVERT QUE LA KINASE PI4KIII α , UNE ENZYME JOUANT UN RÔLE CLÉ DANS LE CONTRÔLE DE LA PRODUCTION DE LIPIDES PHOSPHATIDYLINOSITOLS, S'AVÉRAIT ESSENTIELLE À LA RÉPLICATION DU VHC *in vitro*. UNE AUGMENTATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA PI4KIII α A ÉTÉ OBSERVÉE DANS LES HÉPATOCYTES INFECTÉS PAR LE VHC EN CULTURE CELLULAIRE, AINSI QUE DANS DES ÉCHANTILLONS DE TISSU HÉPATIQUE DE PATIENTS INFECTÉS. CETTE ÉQUIPE A ÉGALEMENT IDENTIFIÉ PI4KIII α COMME PARTENAIRE D'INTERACTION DE LA NS5A DU VHC (AUSSI NS5B) ET CES DERNIÈRES PROTÉINES VIRALES SEMBLENT AVOIR UN EFFET STIMULANT SUR L'ACTIVITÉ DE LA KINASE (REISS ET AL., 2011). POINT INTÉRESSANT DE CETTE ÉTUDE, LES AUTEURS ONT OBSERVÉ QUE L'ABSENCE D'ACTIVITÉ DE PI4KIII α INDUIT UN CHANGEMENT IMPORTANT DANS LA STRUCTURE MORPHOLOGIQUE DU « MEMBRANOUS WEB », LIEU DE PRÉDILECTION DE LA RÉPLICATION DU VHC. D'AUTRES ÉTUDES ONT MONTRÉ UNE INTERACTION PHYSIQUE ENTRE LA POLYMÉRASE VIRALE (NS5B) ET LES PROTÉINES CELLULAIRES ANNEXINE A2 ET hVAP-33. CES PROTÉINES CELLULAIRES EXERCENT UN RÔLE COMMUN DE LIER ET RELOCALISER LES PROTÉINES NON STRUCTURALES DU VHC SUR DES RADEAUX LIPIDIQUES (*lipid raft*) POUR FORMER LE COMPLEXE DE RÉPLICATION (AIZAKI ET AL., 2004; GAO ET AL., 2004b; SAXENA ET AL., 2012; SHI ET AL., 2003).

Malgré les nombreuses études publiées sur la nature et les mécanismes de formation du complexe de réPLICATION, il n'en demeure pas moins que la fonction et le rôle des facteurs de l'hôte en association avec la réPLICASE DU VHC MÉRITENT DAVANTAGE D'INVESTIGATION AFIN DE MIEUX COMPRENDRE LES INTERACTIONS HÔTE-PATHOGÈNE. EN CONCLUSION, À LA LUMIÈRE DE NOS RÉSULTATS, NOUS SUGGÉRONS QUE LES PROTÉINES AUTOPHAGIQUES ET LES MEMBRANES FORMÉES LORS DU PHÉNOMÈNE PRÉCOCE DE L'AUTOPHAGIE SONT INDISPENSABLES À L'ENCHENCHEREMENT DE LA RÉPLICATION DU VHC.

9.6 Conclusion générale

Nous avons développé un modèle murin simple, accessible et peu coûteux permettant la réPLICATION DU VHC ainsi que la production de particules virales *in vivo*. Ce petit modèle animal est basé sur la génération de tumeurs humaines dans des souris immunodéficientes à l'aide de la lignée d'hépatocarcinome humain tumorigénique Huh7-7. Ces cellules humaines infectées par le VHC JFH1 ont la capacité de produire des tumeurs dans l'animal et de sécréter des virions infectieux dans la circulation sanguine.

La simplicité et l'utilité de ce modèle animal sont particulièrement intéressantes au point de vue monétaire pour l'industrie pharmaceutique, particulièrement au niveau du développement des phases précliniques. Par l'entremise de ce modèle animal, les compagnies pharmaceutiques pourraient bénéficier d'indices supplémentaires sur l'efficacité d'antiviraux potentiels avant l'administration chez les patients puisque les phases cliniques subséquentes sont très dispendieuses. Bien que ce modèle animal ne puisse être utilisé pour étudier la pathogénèse du VHC ou encore la réponse immunitaire contre le virus, il pourra servir d'outil décisionnel lors de la sélection de nouvelles molécules ayant une activité antivirale spécifique contre le VHC *in vivo*. Finalement, ce modèle murin simple et accessible à la communauté scientifique ouvrira de nouvelles perspectives en recherche fondamentale dans l'étude des facteurs de virulence du VHC ainsi que dans l'élucidation des interactions entre le virus et certaines protéines humaines endogènes impliquées dans le métabolisme des lipides et l'homéostasie du cholestérol de même que dans l'activation du phénomène autophagique.

À la recherche de nouveaux facteurs cellulaires pouvant interagir avec l'ARN polymérase ARN-dépendante virale NS5B du VHC (RdRp), nous avons effectué un criblage de librairie d'ADNc de foie humain pour identifier des partenaires d'interactions de cette protéine virale jouant un rôle essentiel dans la réPLICATION du virus. Dans la deuxième partie du projet de thèse, nous avons montré que la protéine autophagique ATG5, impliquée dans la formation des DMV intra-cellulaires, interagit spécifiquement avec la protéine NS5B du VHC. Les résultats de cette étude suggèrent que l'interaction ATG5/NS5B est indispensable à la réPLICATION initiale du VHC dans la cellule. Nos résultats montrent bien l'importance des protéines autophagiQUES dans la réPLICATION du VHC *in vitro* et cibler la voie de l'autophagie pourrait ouvrir de nouvelles avenues d'interventions thérapeutiques pour lutter contre le VHC dans un avenir rapproché.

Appendice A

Article co-auteur: PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. Labonté P, Begley S, Guévin C, Asselin MC, Nassoury N, Mayer G, Prat A, Seidah NG. Hepatology. 2009 Jul;50(1):17-24.

Contribution: production des stocks de virus VHC JFH1 et J6/JFH1. Mise au point de méthodes de détection du VHC : immunobuvardage de type western, immunofluorescence et de RT-PCR en temps réel (Taqman).

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.

Abstract

Human PCSK9 is known to enhance the degradation of membrane-bound receptors such as the hepatocyte low-density lipoprotein receptor (LDLR), ApoER2, and very low-density lipoprotein receptor. Because the LDLR is suspected to be involved in hepatitis C virus (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 pseudoparticles. 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 LDLR and/or CD81 protein expression levels were significantly reduced, but not those of transferrin and scavenger receptor class B type 1. *Conclusion:* Our results demonstrate an antiviral effect of the circulating liver PCSK9 on HCV in cells and show that PCSK9 down-regulates 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 humans. (HEPATOLOGY 2009.)

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 pegylated 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 the acknowledged receptors or coreceptors of HCV are: CD81,⁶ scavenger receptor class B type I,⁷ low-density lipoprotein receptor (LDLR),⁸ and the recently identified claudin-1, claudin-6, claudin-9,⁹ and occludin.¹⁰ However, it is unclear which ones 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 lipoviroparticles of HCV coated with apolipoprotein B and E.¹¹ Because LDLR controls the uptake of circulating cholesterol principally through internalization of apolipoprotein B- and E-containing lipoproteins, such as LDL and very low-density lipoprotein, the implication of LDLR as a nonspecific 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 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 humans and mice, 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 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 nonsecreted PCSK9, which is much more potent in enhancing the degradation of LDLR and its two closest family members, very low-density lipoprotein receptor and ApoER2.²⁴ We used these chimeras to reduce 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. Because 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.

HCV, hepatitis C virus; HCVpp, hepatitis C virus pseudoparticles; LDLR, low-density lipoprotein receptor; siRNA, small interfering RNA.

Methods and 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 via fluorescence-activated cell sorting (FACS) to isolate the ≈10% highest expressors of cell surface PCSK9 (Fig. 1B), as confirmed by immunoblotting of cell lysates (Fig. 1C). Although 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 surface²⁴ 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 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 (Supporting Fig. 1).

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 to 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 48 hours 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 (Fig. 3F,I,L). The loss of CD81 is dependent on PCSK9 expression because all cells

transfected with the control plasmid do express CD81 (Fig. 3B). Interestingly, whereas the secretable PCSK9-wt did diminish the levels of CD81 in some neighboring cells not expressing PCSK9 (Fig. 3F), the membrane-bound forms did not (Fig. 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 compared with HuH7 cells expressing ACE2 alone or the empty vector (Fig. 4A). HuH7 cells stably expressing PCSK9-ACE2 are more resistant to HCV JFH1, because only very rare single cells were 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 populations 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 nonstructural protein NS5A, respectively (Fig. 4B). Using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, 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 transmembrane domain/cytoplasmic tail 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 a cell defect that appeared following the selection of the stable cellular pool. Accordingly, prior to infection, naïve HuH7 cells were preincubated with various concentrations of purified soluble PCSK9 up to 15 μ g/mL (Fig. 5).²⁷ The number of foci revealed that PCSK9 can inhibit HCV infection up to 2.5-fold (Fig. 5A) in a dose-dependent manner, demonstrating that PCSK9 is the mediator of the observed viral inhibition.

PCSK9-ACE2 Inhibits HCV Pseudoparticle Infection.

To confirm that CD81 is critical for the loss of infectivity in PCSK9-positive cells, we used HCV pseudoparticles (HCVpp) and VSV pseudoparticles as a 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 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 via 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 has been observed in HuH7 cells.^{29, 30} Accordingly, knockdown of LDLR messenger RNA 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 Livers of PCSK9 Knockout 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 favor of a down-regulation of liver CD81 protein levels by PCSK9. Next, we analyzed the level of both CD81 and LDLR via immunofluorescence of 10 μm-thick liver

cryosections from two different mice for each genotype. The results revealed that the labeling of CD81 appeared noticeably higher over the basolateral membrane of hepatocytes, facing sinusoids, in the *Pcsk9*^{-/-} mice, as compared with 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 livers of double knockout mice lacking both PCSK9 and LDLR.²¹ Here also, the level of CD81 was distinctly higher in the livers of double knockout mice when compared with wild-type animals, suggesting that PCSK9 down-regulates CD81 independently from LDLR (Fig. 7B, right panels). These experiments were also repeated with a different antibody against CD81 (EAT1, 1/20, Santa Cruz Biotechnology, CA), and generated similar results (data not shown). As positive controls, we visualized LDLR in the same mice and noted that LDLR is highly expressed in the livers of *Pcsk9*^{-/-} mice (Fig. 7B, left panels), as reported.²¹ We also showed that the liver immunoreactivity of the hepatocyte growth factor receptor and scavenger receptor class B type 1, another HCV receptor, were not significantly different in wild-type, PCSK9 knockout, and transgenic mice overexpressing PCSK9 in hepatocytes (PCSK9-Tg) (Fig. S2).²¹ These data extend the *ex vivo* effects of PCSK9 in hepatocytes toward 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 very low-density lipoprotein receptor from the cell surface, due to its enhanced sorting toward 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 because it is tightly bound to its inhibitory pro-domain.^{13–16} Our data show 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 neighboring 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 To our knowledge, this is the first report demonstrating that PCSK9 can down-regulate 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 \approx 7 µg/mL (Fig. 5), a value well above some of the reported circulating levels of PCSK9 in human (0.05-0.6 µg/mL),²³ though using a different quantitation technique, a mean value of plasma PCSK9 that is \approx 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 humans, 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 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 up-regulation of CD81 observed in *Pcsk9*^{-/-} mice (Fig. 7A) established the relevance of PCSK9 as an antiviral target that requires confirmation in humans.

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 cell culture-adapted HCV.^{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 favor of our assumption suggesting that higher circulating levels of PCSK9 may correlate with lower viremia, a hypothesis that needs experimental validation. It must be noted, however, 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 up-regulating PCSK9 and lowering LDL cholesterol may be appropriate. This may include the combination of statins, which are known to up-regulate PCSK9³⁵ and down-regulate LDL cholesterol, and a mimic of the domain of PCSK9 that interacts with CD81.

In conclusion, this study demonstrates that hepatic PCSK9 can down-regulate *in vitro* two of the putative *in vivo* liver receptors of HCV, namely CD81 and LDLR. The fate of other suspected *in vivo* HCV receptors or coreceptors has not yet been determined. Because higher plasma LDL cholesterol (known to be positively regulated by PCSK9) in HCV patients correlates 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 via enzyme-linked immunosorbent assay 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.

Acknowledgements

We appreciate the gifts of JFH1 and J6/JFH1 from Dr. Takaji Wakita and Dr. Ralf Bartenschlager, respectively. We thank Josée Hamelin and Edwidge Marcinkiewicz for technical assistance and Brigitte Mary for secretarial help. We also thank Drs. Rex Parker and Franck Duclos for purified PCSK9 and Dr. Francois-Loïc Cosset for pseudoparticle constructs.

References

1. Thomson BJ, Finch RG. Hepatitis C virus infection. *Clinical Microbiology and Infection* 2005;11:86-94.
2. Pownard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003;362:2095-2100.
3. Simmonds P, Bukh J, Combe 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. 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): hepatocytespecific 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, Blasiola 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, Piliez 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, Stamatakis 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 apoptosisregulated 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.

Figures legends

Figure 1. Stable PCSK9-wt and PCSK9-ACE2 expression in HuH7 cells. (A) Recombinant proteins used were: signal peptide (sp); prosegment (pro); cysteine and histidine-rich domain (CHRD); transmembrane domain (TM); cytoplasmic tail (CT). (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 via immunocytochemistry on a confocal microscope. HuH7 cells were transiently transfected with complementary DNAs 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 72 hours post infection. Colonies were visualized via immunostaining of the NS5A protein and the nuclei were stained with DAPI. (B) Inset, western blotting showing the HCV NS5A protein and β-actin in the infected cells (15 days post infection). The quantification of the remaining NS5A protein expression in the infected HuH7 cells was calculated from the blot (inset). Infected normal HuH7 cells were arbitrary set as 100% and the NS5A expression level were normalized to the chemiluminescence of β-actin. (C) Intracellular JFH-1 RNA at 15 days post infection was calculated via quantitative polymerase chain reaction. 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 (0-15 µg/mL) for 4 hours prior to infection with J6/JFH1 in the presence PCSK9. At 3 days post infection, 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 with 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 VSV pseudoparticles. Luciferase activity (RLU) was calculated 72 hours post infection, and pseudoparticle infectivity was calculated relative to the infection of HuH7 cells by HCVpp, arbitrarily set at 100%. VSV pseudoparticle infections were used as positive controls. The values are the average of five independent experiments. (B) HuH7 cells were transfected in duplicate with a nonspecific siRNA as negative control (NC) or siRNAs directed against LDLR (siRNA-A and siRNA-B). Expression was verified 48 hours post transfection via western blotting. (C) HuH7 and PCSK9-ACE2 cells were transfected with siRNA-NC or siRNA-A. Expression of CD81 was verified 48 hours post transfection via 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 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as a control. (B) LDLR and CD81 expression were analyzed via immunohistochemistry (green) in liver cryosections of wild-type, single knockout (*Pcsk9*^{-/-}), and double knockout (*Pcsk9*^{-/-}/*Ldlr*^{-/-}) mice. For each condition, at least 10 fields were compared. These experiments were repeated twice. Nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue). Bars = 20 µm.

Figure 1

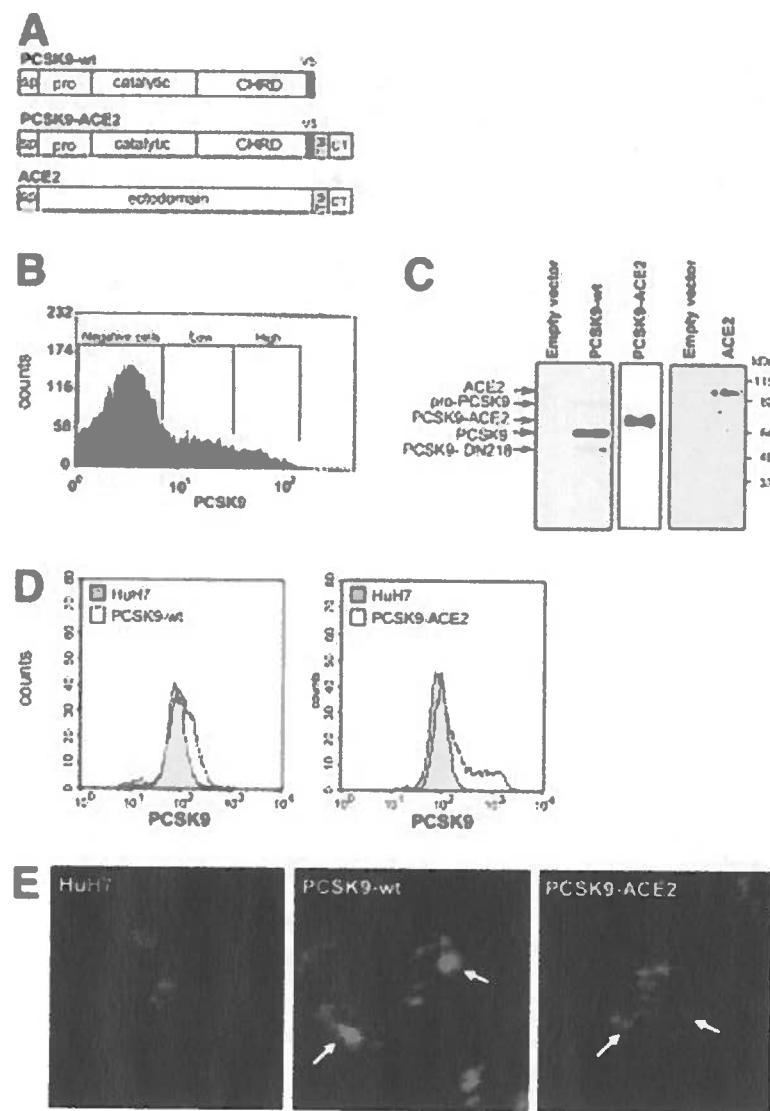


Figure 2

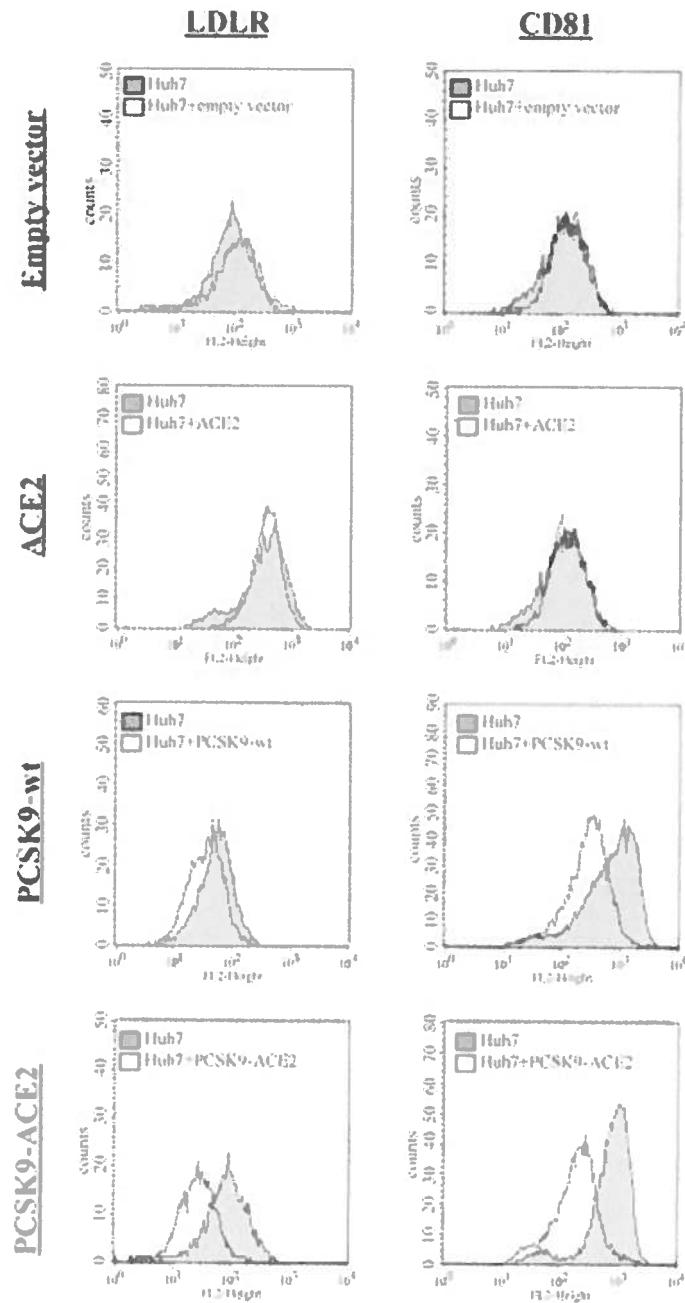


Figure 3

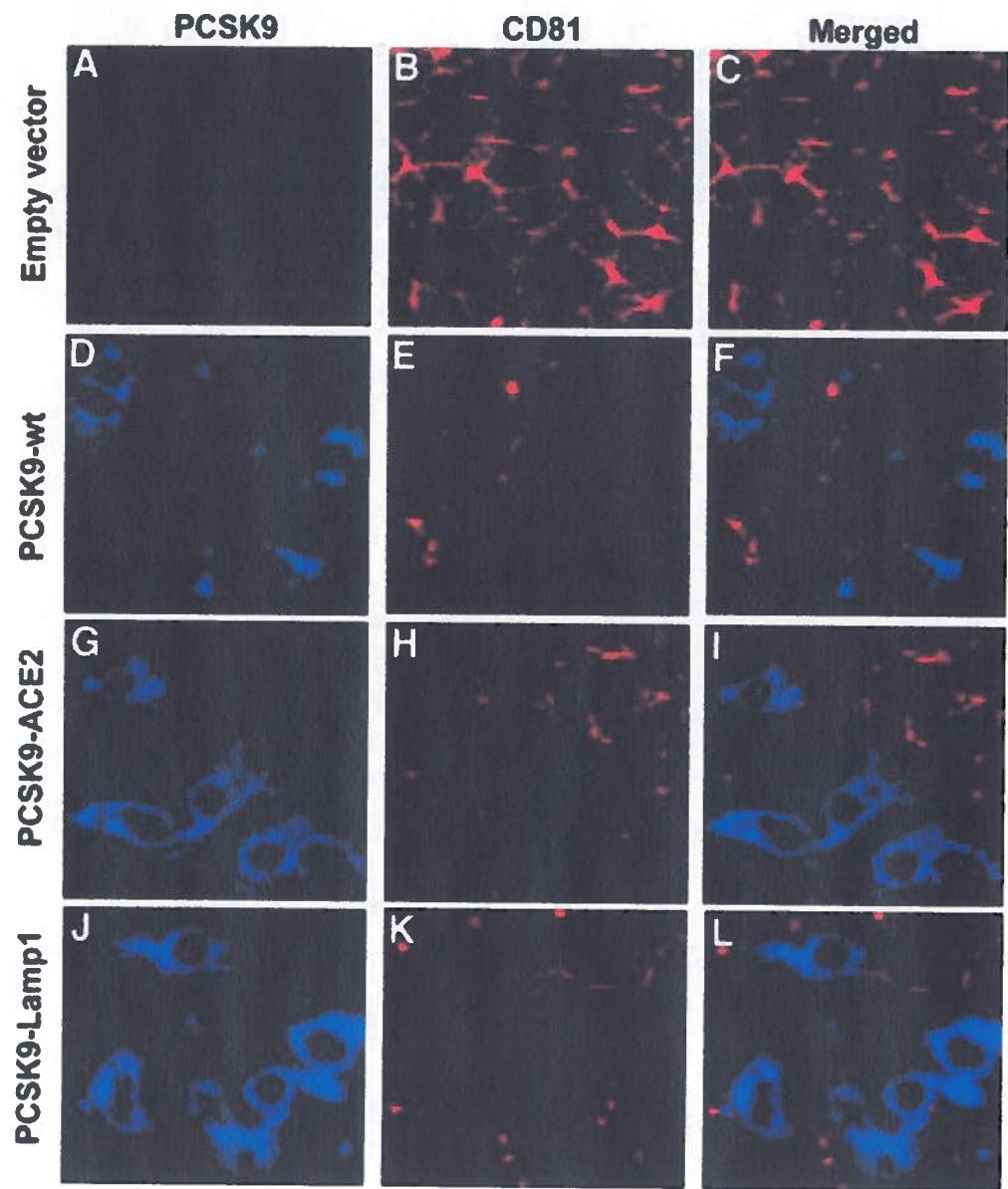


Figure 4

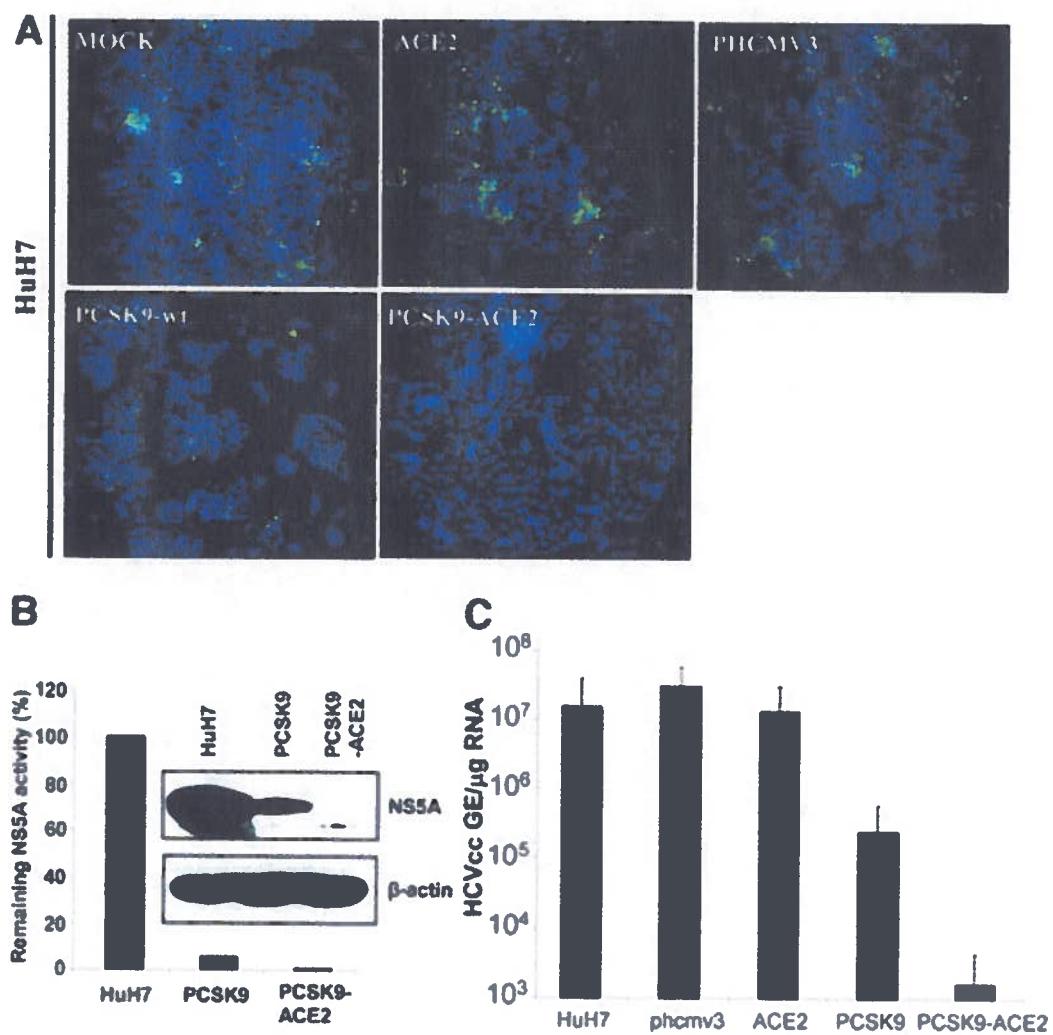


Figure 5

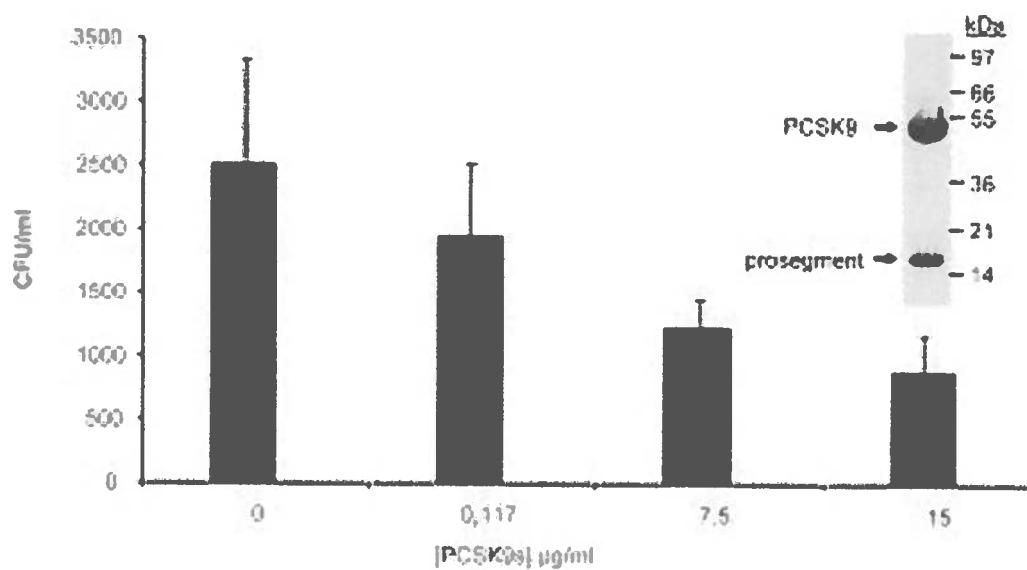


Figure 6

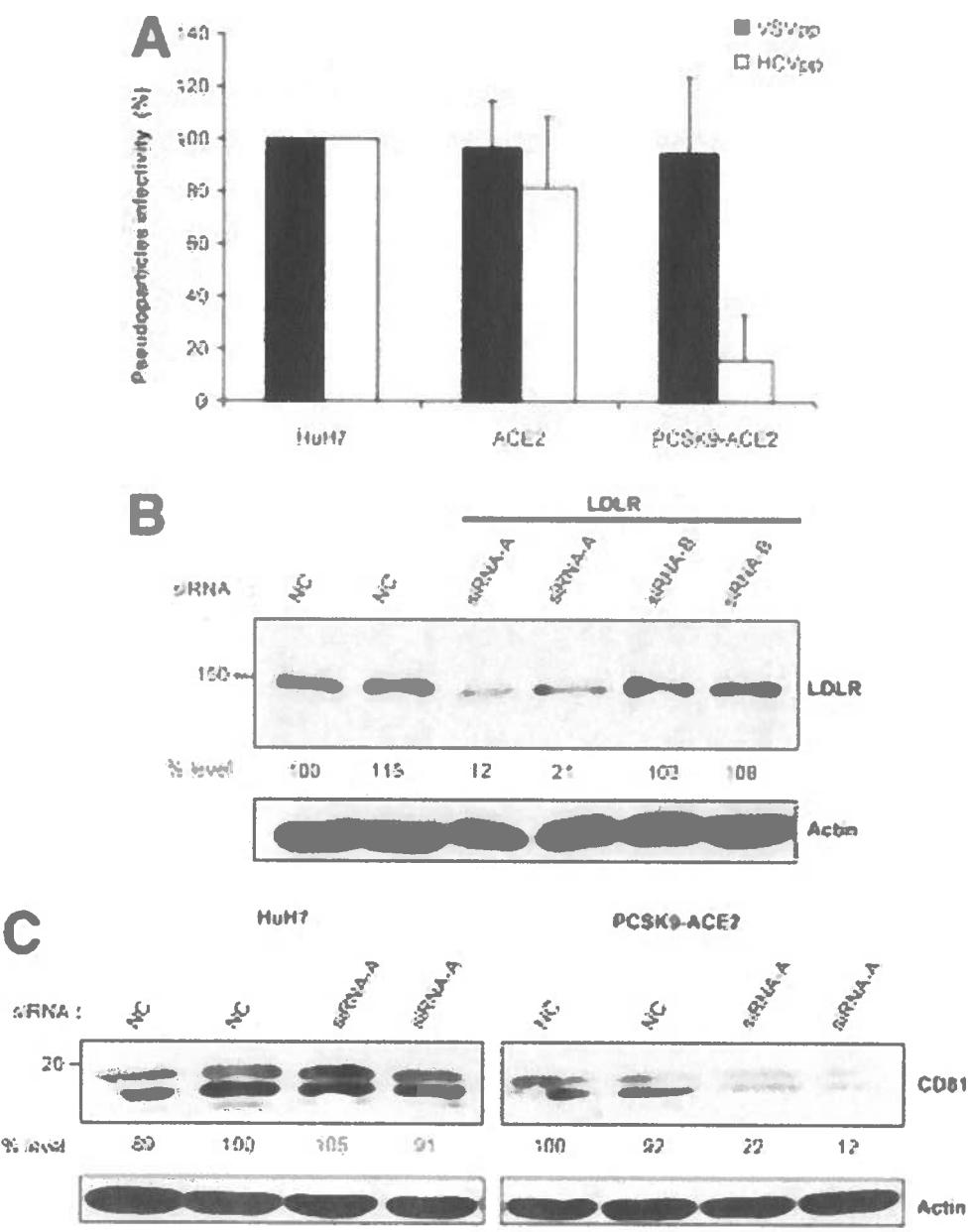
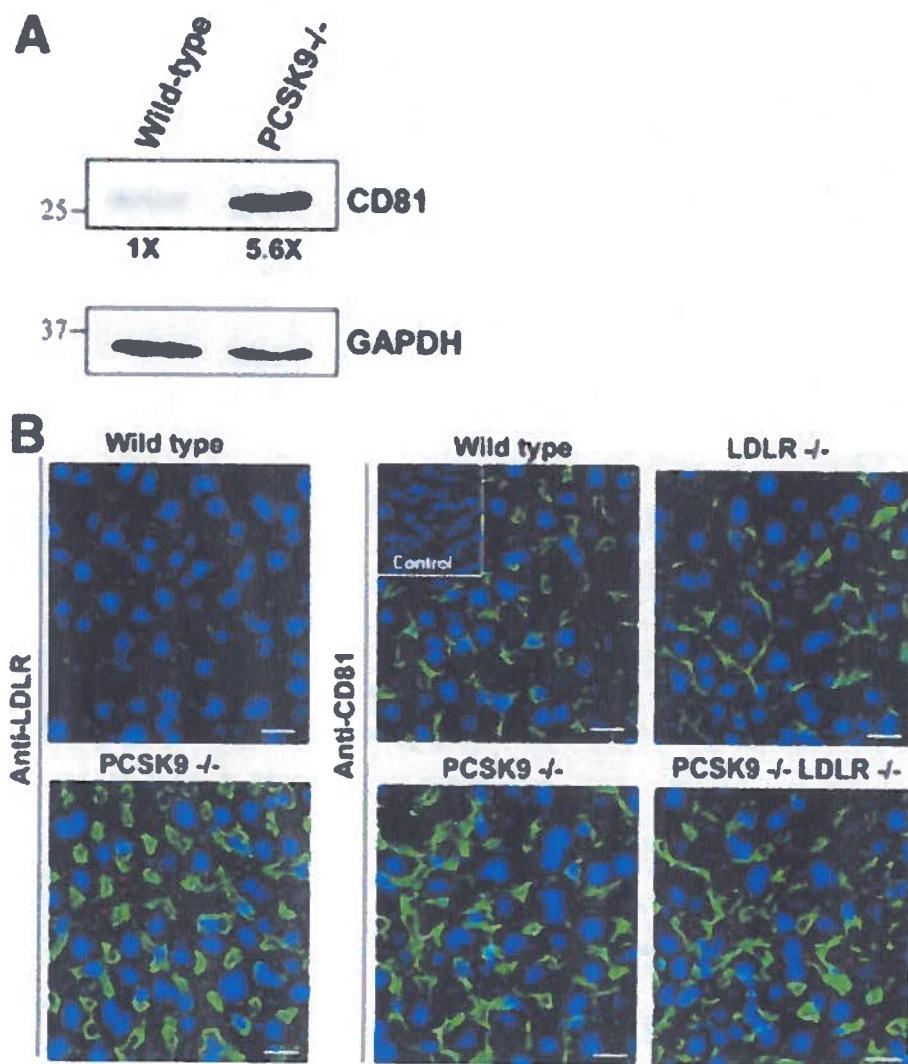


Figure 7



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 1 h 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'-GAGTGGGTTATCCAAGAAAG-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'-CGGAATTGCCGGGAAGACTG-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 (Corbett 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 x 10⁶ 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% TritonTM 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 SuperSignalTM 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 ChemigeniusTM gel documentation system (Syngene).

PCSK9 Inhibition Assay. HuH7 cells were seeded on a 96 well plate at a density of 8 x 10³ cells per well 24h before the addition of a serial dilution of purified human PCSK9 (range from 0 to 15 µg/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 x 10⁶ 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 -80oC. 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 x 10⁴ 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 x 10⁵ 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 µg 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 AlphaImager 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

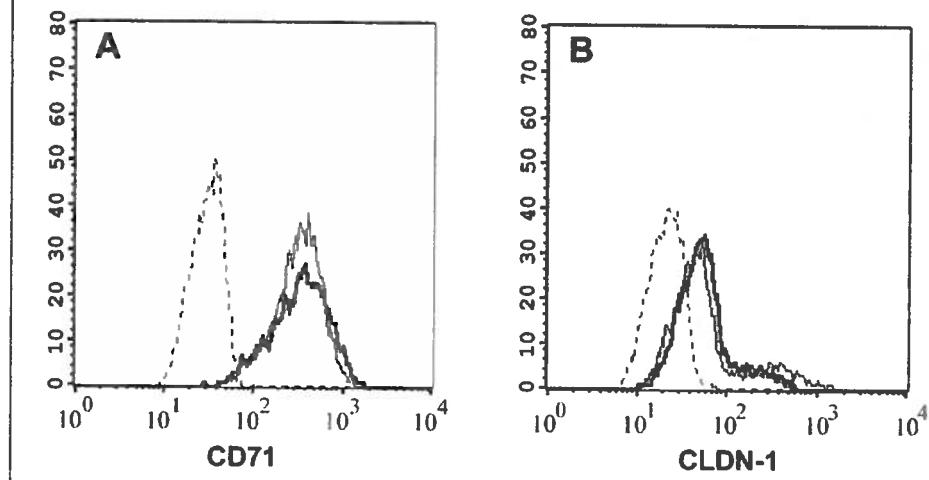
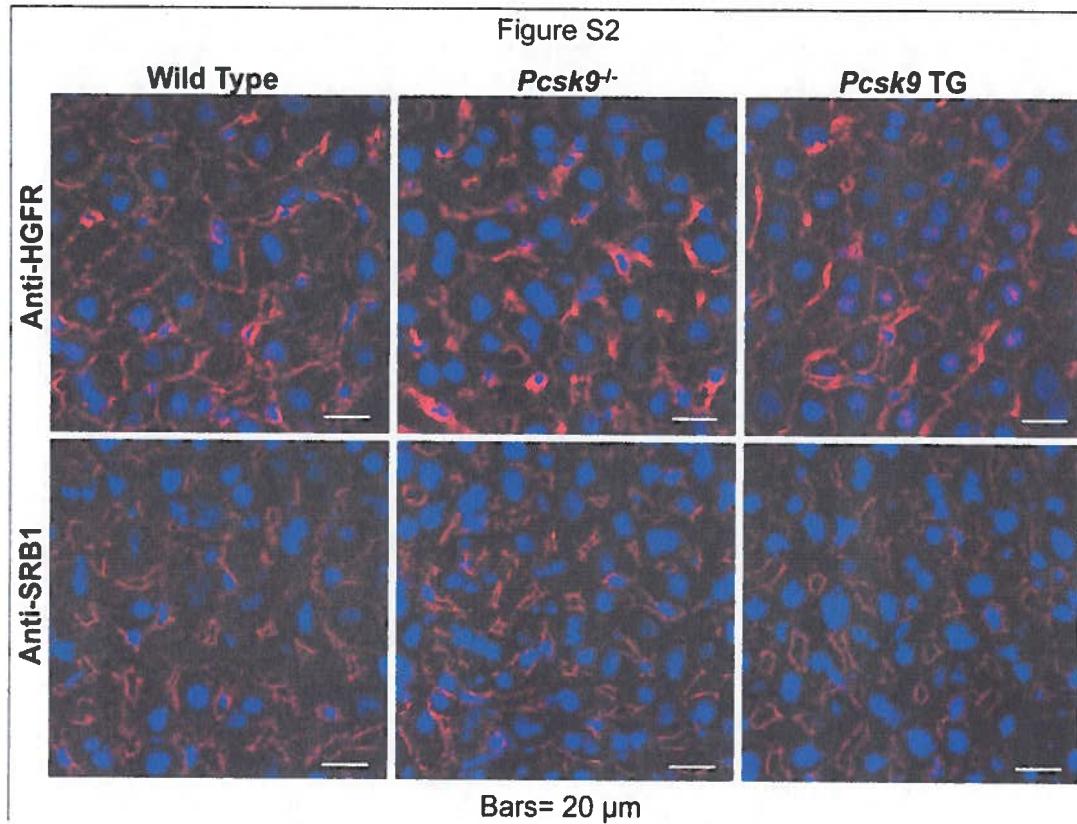


Figure S2



Appendice B

Résultats supplémentaires

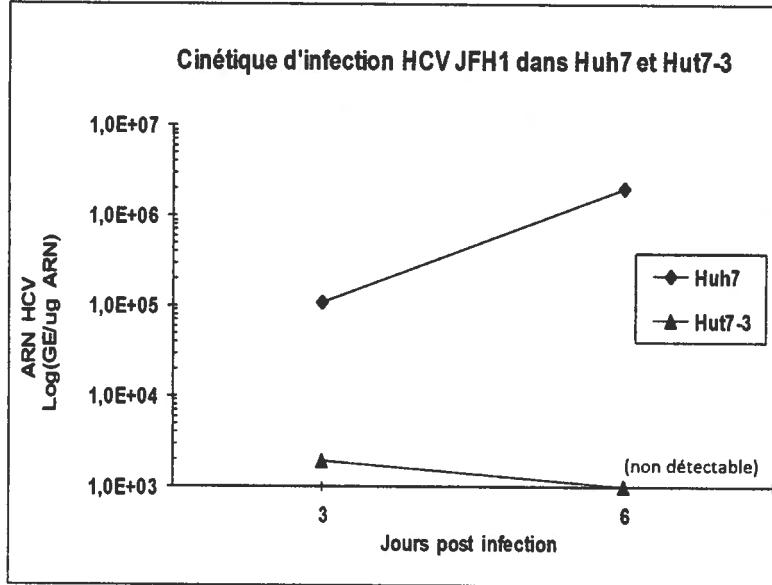


Figure S 1 Cinétique d'infection au VHC JFH1 des lignées cellulaires Huh7 et HuT7-3.

Mesure de l'ARN viral intracellulaire par qRT-PCR (Taqman)

Tableau S 1 Caractéristiques des différentes souches de souris immunodéficientes utilisées lors des expériences de xénogreffes de cellules d'hépatocarcinome

Souche de souris	Déficience en cellules T	Déficience en cellules B	Déficience en cellules NK	Efficacité de la xénogreffe
CD1-Nude	Oui	Non	Non	+
SCID	Oui	Oui	Non	++
SCID/Beige	Oui	Oui	Diminué	+++

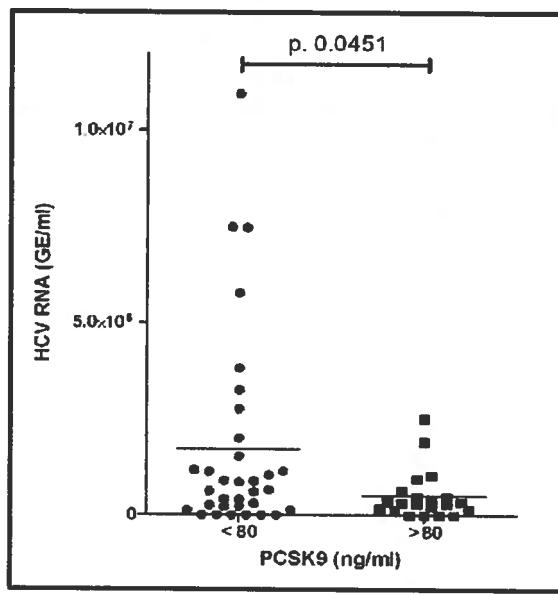


Figure S 2 Comparaison entre le titre viral du VHC (GE /ml) et la quantité de protéine PCSK9 (ng/ml) dans le sang des individus infectés par le virus avant traitement (n=50)

Appendice C

**Production des stocks d'adénovirus recombinants PCSK9 en vue
de leur utilisation ultérieure dans le modèle animal du VHC**

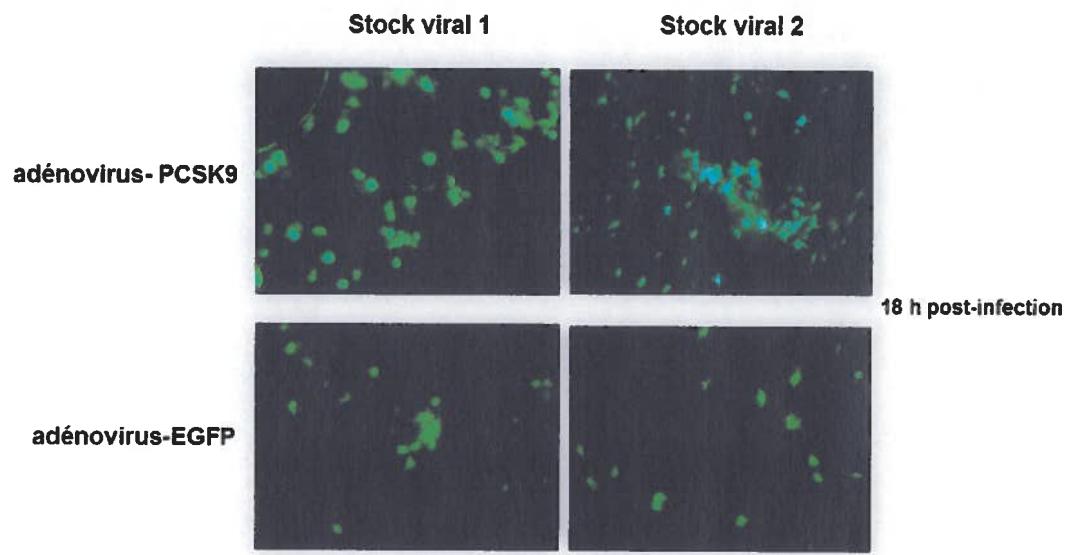


Figure S 3 Expression de l'EGFP dans les cellules 293 suite à l'infection par des adénovirus recombinants.

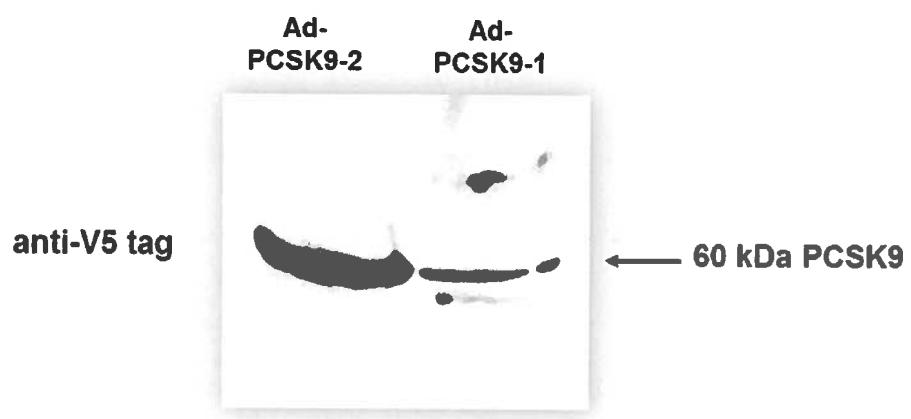


Figure S 4 Immunobuvardage montrant la protéine PCSK9-V5 sécrétée dans le surnageant des cellules 293 suite à l'infections par deux stocks viraux d'adénovirus PCSK9.

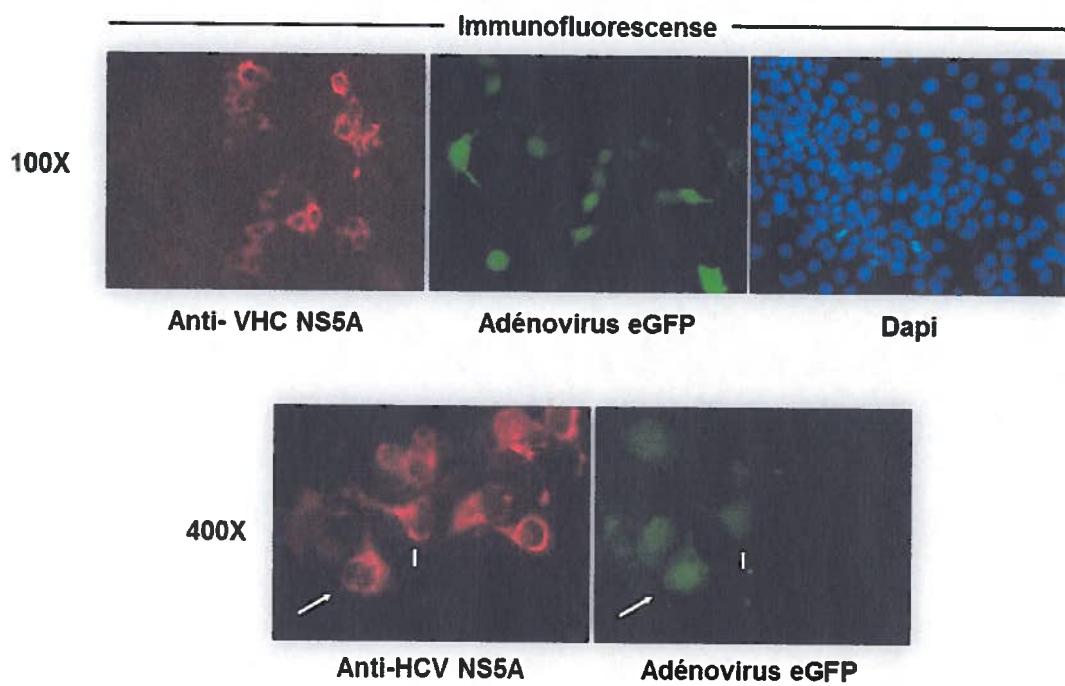


Figure S 5 Super infection avec l'adénovirus eGFP et VHC JFH1 dans les cellules tumorigéniques Huh7.7.

Les cellules Huh7.7 ont été infectées avec l'adénovirus eGFP et VHC JFH1 (MOI de 0,001) pendant 48 h et marquée avec anti-VHC NS5A.

10 Références

- Aach, R. D., Hollinger, F. B., Szmuness, W., Mosley, J. W., Gitnick, G. L., Kahn, R. A., Stevens, C. E., Goodwin, D., and Weiner, J. M. (1980). Post-transfusion hepatitis: analysis of risk factors. *Acta Haematol Pol* 11(3), 159-64.
- Abe, K., Inchauspe, G., Shikata, T., and Prince, A. M. (1992). Three different patterns of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Hepatology* 15(4), 690-5.
- Abe, T., Kaname, Y., Hamamoto, I., Tsuda, Y., Wen, X., Taguwa, S., Moriishi, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Kanto, T., Hayashi, N., Akira, S., and Matsuura, Y. (2007). Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J Virol* 81(17), 8953-66.
- 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., and Boileau, C. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 34(2), 154-6.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q. X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22), 12766-71.
- Agnello, V., and De Rosa, F. G. (2004). Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues. *J Hepatol* 40(2), 341-52.
- Ago, H., Adachi, T., Yoshida, A., Yamamoto, M., Habuka, N., Yatsunami, K., and Miyano, M. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure* 7(11), 1417-26.
- Ait-Goughoulte, M., Kanda, T., Meyer, K., Ryerse, J. S., Ray, R. B., and Ray, R. (2008). Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J Virol* 82(5), 2241-9.
- Aizaki, H., Choi, K. S., Liu, M., Li, Y. J., and Lai, M. M. (2006). Polypyrimidine-tract-binding protein is a component of the HCV RNA replication complex and necessary for RNA synthesis. *J Biomed Sci* 13(4), 469-80.
- Aizaki, H., Lee, K. J., Sung, V. M., Ishiko, H., and Lai, M. M. (2004). Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 324(2), 450-61.
- Albecka, A., Belouzard, S., de Beeck, A. O., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Terce, F., Duverlie, G., Rouille, Y., and Dubuisson, J. (2012). Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 55(4), 998-1007.
- Aligo, J., Jia, S., Manna, D., and Konan, K. V. (2009). Formation and function of hepatitis C virus replication complexes require residues in the carboxy-terminal domain of NS4B protein. *Virology* 393(1), 68-83.
- Amemiya, F., Maekawa, S., Itakura, Y., Kanayama, A., Matsui, A., Takano, S., Yamaguchi, T., Itakura, J., Kitamura, T., Inoue, T., Sakamoto, M., Yamauchi, K., Okada, S., Yamashita, A., Sakamoto, N., Itoh, M., and Enomoto, N. (2008). Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 197(3), 361-70.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J. L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G., and Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76(14), 6919-28.

- Andre, P., Perlemuter, G., Budkowska, A., Brechot, C., and Lotteau, V. (2005). Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Seminars in liver disease* **25**(1), 93-104.
- Appel, N., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2005). Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol* **79**(5), 3187-94.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Fribe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* **4**(3), e1000035.
- Azuma, H., Paulk, N., Ranade, A., Dorrell, C., Al-Dhalimy, M., Ellis, E., Strom, S., Kay, M. A., Finegold, M., and Grompe, M. (2007). Robust expansion of human hepatocytes in Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-} mice. *Nat Biotechnol* **25**(8), 903-10.
- Backes, P., Quinkert, D., Reiss, S., Binder, M., Zayas, M., Rescher, U., Gerke, V., Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2010). Role of annexin A2 in the production of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* **84**(11), 5775-89.
- Bacon, B. R., Gordon, S. C., Lawitz, E., Marcellin, P., Vierling, J. M., Zeuzem, S., Poordad, F., Goodman, Z. D., Sings, H. L., Boparai, N., Burroughs, M., Brass, C. A., Albrecht, J. K., and Esteban, R. (2011). Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* **364**(13), 1207-17.
- Balagopal, A., Thomas, D. L., and Thio, C. L. (2010). IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **139**(6), 1865-76.
- Bartenschlager, R., Frese, M., and Pietschmann, T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* **63**, 71-180.
- Bartenschlager, R., and Sparacio, S. (2007). Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Res* **127**(2), 195-207.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F. L. (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **197**(5), 633-42.
- Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J. M., Lavillette, D., and Cosset, F. L. (2005). An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol* **79**(13), 8217-29.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A., and 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**(43), 41624-30.
- Bassett, S. E., Brasky, K. M., and Lanford, R. E. (1998). Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *J Virol* **72**(4), 2589-99.
- Behrens, S. E., Tomei, L., and De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* **15**(1), 12-22.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Barreiro, O., Maldonado-Rodriguez, A., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M., and Majano, P. L. (2008). Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* **48**(4), 1044-53.
- 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., and 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**(47), 48865-75.
- Berger, K. L., Cooper, J. D., Heaton, N. S., Yoon, R., Oakland, T. E., Jordan, T. X., Mateu, G., Grakoui, A., and Randall, G. (2009). Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(18), 7577-82.
- Bergeron, A., Jorquera, R., and Tanguay, R. M. (2003). [Hereditary tyrosinemia: an endoplasmic reticulum stress disorder?]. *Med Sci (Paris)* **19**(10), 976-80.
- Berkova, Z., Crawford, S. E., Trugnan, G., Yoshimori, T., Morris, A. P., and Estes, M. K. (2006). Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasms. *J Virol* **80**(12), 6061-71.
- Bigger, C. B., Brasky, K. M., and Lanford, R. E. (2001). DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* **75**(15), 7059-66.
- Binder, M., Quinkert, D., Bochkarova, O., Klein, R., Kezmic, N., Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2007). Identification of determinants involved in initiation of hepatitis C virus RNA synthesis by using intergenotypic replicase chimeras. *J Virol* **81**(10), 5270-83.
- Bissig, K. D., Le, T. T., Woods, N. B., and Verma, I. M. (2007). Repopulation of adult and neonatal mice with human hepatocytes: a chimeric animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(51), 20507-11.
- Bissig, K. D., Wieland, S. F., Tran, P., Isogawa, M., Le, T. T., Chisari, F. V., and Verma, I. M. (2010). Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest* **120**(3), 924-30.
- Blight, K. J., McKeating, J. A., and Rice, C. M. (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **76**(24), 13001-14.
- Blight, K. J., and Rice, C. M. (1997). Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* **71**(10), 7345-52.
- Bode, J. G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Albrecht, U., Erhardt, A., Schaper, F., Heinrich, P. C., and Haussinger, D. (2003). IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* **17**(3), 488-90.
- Borawski, J., Troke, P., Puyang, X., Gibaja, V., Zhao, S., Mickanin, C., Leighton-Davies, J., Wilson, C. J., Myer, V., Cornellataracido, I., Baryza, J., Tallarico, J., Joberty, G., Bantscheff, M., Schirle, M., Bouwmeester, T., Mathy, J. E., Lin, K., Compton, T., Labow, M., Wiedmann, B., and Gaither, L. A. (2009). Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *J Virol* **83**(19), 10058-74.
- Bosman, C., Valli, M. B., Bertolini, L., Serafino, A., Boldrini, R., Marcellini, M., and Carloni, G. (1998). Detection of virus-like particles in liver biopsies from HCV-infected patients. *Research in virology* **149**(5), 311-4.
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R. G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J. P., Penin, F., and McLauchlan, J. (2006). Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* **281**(31), 22236-47.
- Boulant, S., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2007). Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol* **88**(Pt 8), 2204-13.
- Boumlic, A., Nomine, Y., Charbonnier, S., Dalagiorgou, G., Vassilaki, N., Kieffer, B., Trave, G., Mavromara, P., and Orfanoudakis, G. (2010). Prevalence of intrinsic disorder in the hepatitis C virus ARFP/Core+1/S protein. *FEBS J* **277**(3), 774-89.
- Bowen, D. G., and Walker, C. M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* **436**(7053), 946-52.

- Branch, A. D., Stump, D. D., Gutierrez, J. A., Eng, F., and Walewski, J. L. (2005). The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* **25**(1), 105-17.
- Brass, C. A. (1998). Efficacy of interferon monotherapy in the treatment of relapsers and nonresponders with chronic hepatitis C infection. *Clin Ther* **20**(3), 388-97.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F. A., and De Francesco, R. (2002). Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *Journal of virology* **76**(7), 3482-92.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F. A. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23), 13034-9.
- Brezillon, N. M., DaSilva, L., L'Hote, D., Bernex, F., Piquet, J., Binart, N., Morosan, S., and Kremsdorf, D. (2008). Rescue of fertility in homozygous mice for the urokinase plasminogen activator transgene by the transplantation of mouse hepatocytes. *Cell Transplant* **17**(7), 803-12.
- Brinton, M. A., and Dispoto, J. H. (1988). Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology* **162**(2), 290-9.
- Bukh, J. (2004). A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology* **39**(6), 1469-1475.
- Bukh, J., Pietschmann, T., Lohmann, V., Krieger, N., Faulk, K., Engle, R. E., Govindarajan, S., Shapiro, M., St Claire, M., and Bartenschlager, R. (2002). Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22), 14416-21.
- Burlone, M. E., and Budkowska, A. (2009). Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* **90**(Pt 5), 1055-70.
- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* **76**(8), 3720-30.
- Chang, K. S., Jiang, J., Cai, Z., and Luo, G. (2007). Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *Journal of virology* **81**(24), 13783-93.
- Chiba, T., Kita, K., Zheng, Y. W., Yokosuka, O., Saisho, H., Iwama, A., Nakauchi, H., and Taniguchi, H. (2006). Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* **44**(1), 240-251.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**(4902), 359-62.
- Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, R., Barr, P. J., and et al. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6), 2451-5.
- Choo, Q. L., Weiner, A. J., Overby, L. R., Kuo, G., Houghton, M., and Bradley, D. W. (1990). Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* **46**(2), 423-41.
- Chu, V. C., Bhattacharya, S., Nomoto, A., Lin, J., Zaidi, S. K., Oberley, T. D., Weinman, S. A., Azhar, S., and Huang, T. T. (2011). Persistent expression of hepatitis C virus non-structural proteins leads to increased autophagy and mitochondrial injury in human hepatoma cells. *PLoS One* **6**(12), e28551.

- Ciesek, S., Steinmann, E., Wedemeyer, H., Manns, M. P., Neyts, J., Tautz, N., Madan, V., Bartenschlager, R., von Hahn, T., and Pietschmann, T. (2009). Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A. *Hepatology* **50**(5), 1638-45.
- Clarke, B. (1997). Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* **78** (Pt 10), 2397-410.
- Cocquerel, L., Op de Beeck, A., Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J* **21**(12), 2893-902.
- Cocquerel, L., Quinn, E. R., Flint, M., Hadlock, K. G., Foung, S. K., and Levy, S. (2003). Recognition of native hepatitis C virus E1E2 heterodimers by a human monoclonal antibody. *J Virol* **77**(2), 1604-9.
- Connelly, M. A., and Williams, D. L. (2004). Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr Opin Lipidol* **15**(3), 287-95.
- Cooper, S., Erickson, A. L., Adams, E. J., Kansopon, J., Weiner, A. J., Chien, D. Y., Houghton, M., Parham, P., and Walker, C. M. (1999). Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* **10**(4), 439-49.
- Dandri, M., Burda, M. R., Gocht, A., Torok, E., Pollok, J. M., Rogler, C. E., Will, H., and Petersen, J. (2001a). Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation. *Hepatology* **34**(4 Pt 1), 824-33.
- Dandri, M., Burda, M. R., Torok, E., Pollok, J. M., Iwanska, A., Sommer, G., Rogiers, X., Rogler, C. E., Gupta, S., Will, H., Greten, H., and Petersen, J. (2001b). Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* **33**(4), 981-8.
- Dane, D. S., Cameron, C. H., and Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**(7649), 695-8.
- Date, T., Kato, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Yasui, K., Mizokami, M., and Wakita, T. (2004). Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem* **279**(21), 22371-6.
- De Francesco, R., and Steinkuhler, C. (2000). Structure and function of the hepatitis C virus NS3-NS4A serine proteinase. *Curr Top Microbiol Immunol* **242**, 149-69.
- de Haan, C. A., and Reggiori, F. (2008). Are nidoviruses hijacking the autophagy machinery? *Autophagy* **4**(3), 276-9.
- de Jong, Y. P., Rice, C. M., and Ploss, A. (2010). New horizons for studying human hepatotropic infections. *J Clin Invest* **120**(3), 650-3.
- Deretic, V., and Levine, B. (2009). Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* **5**(6), 527-49.
- Di Bisceglie, A. M., McHutchinson, J., and Rice, C. M. (2002). New therapeutic strategies for hepatitis C. *Hepatology* **35**(1), 224-231.
- Dorner, M., Horwitz, J. A., Robbins, J. B., Barry, W. T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C. T., Schoggins, J. W., Catanese, M. T., Burton, D. R., Law, M., Rice, C. M., and Ploss, A. (2011). A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* **474**(7350), 208-11.
- Dreux, M., and Chisari, F. V. (2009). Autophagy proteins promote hepatitis C virus replication. *Autophagy* **5**(8), 1224-5.
- Dreux, M., and Chisari, F. V. (2011). Impact of the autophagy machinery on hepatitis C virus infection. *Viruses* **3**(8), 1342-57.

- Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S. F., and Chisari, F. V. (2009). The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(33), 14046-51.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**(12), 5974-84.
- Eigen, M. (1971). Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**(10), 465-523.
- Einav, S., Elazar, M., Danieli, T., and Glenn, J. S. (2004). A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* **78**(20), 11288-95.
- Einav, S., Gerber, D., Bryson, P. D., Sklan, E. H., Elazar, M., Maerkl, S. J., Glenn, J. S., and Quake, S. R. (2008). Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nat Biotechnol* **26**(9), 1019-27.
- Elazar, M., Cheong, K. H., Liu, P., Greenberg, H. B., Rice, C. M., and Glenn, J. S. (2003). Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **77**(10), 6055-61.
- Eng, F. J., Walewski, J. L., Klepper, A. L., Fishman, S. L., Desai, S. M., McMullan, L. K., Evans, M. J., Rice, C. M., and Branch, A. D. (2009). Internal initiation stimulates production of p8 minicore, a member of a newly discovered family of hepatitis C virus core protein isoforms. *J Virol* **83**(7), 3104-14.
- Eren, R., Landstein, D., Terkieltaub, D., Nussbaum, O., Zauberman, A., Ben-Porath, J., Gopher, J., Buchnick, R., Kovjazin, R., Rosenthal-Galili, Z., Aviel, S., Ilan, E., Shoshany, Y., Neville, L., Waisman, T., Ben-Moshe, O., Kischitsky, A., Foung, S. K., Keck, Z. Y., Pappo, O., Eid, A., Jurim, O., Zamir, G., Galun, E., and Dagan, S. (2006). Preclinical evaluation of two neutralizing human monoclonal antibodies against hepatitis C virus (HCV): a potential treatment to prevent HCV reinfection in liver transplant patients. *J Virol* **80**(6), 2654-64.
- Ernst, E., Schonig, K., Bugert, J. J., Blaker, H., Pfaff, E., Stremmel, W., and Encke, J. (2007). Generation of inducible hepatitis C virus transgenic mouse lines. *J Med Virol* **79**(8), 1103-12.
- Esposito, V., Palescandolo, E., Spugnini, E. P., Montesarchio, V., De Luca, A., Cardillo, I., Cortese, G., Baldi, A., and Chirianni, A. (2006). Evaluation of antitumoral properties of the protease inhibitor indinavir in a murine model of hepatocarcinoma. *Clinical Cancer Research* **12**(8), 2634-2639.
- Evans, M. J., Rice, C. M., and Goff, S. P. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(35), 13038-43.
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D., and Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**(7137), 801-5.
- Farci, P., Bukh, J., and Purcell, R. H. (1997). The quasispecies of hepatitis C virus and the host immune response. *Springer Semin Immunopathol* **19**(1), 5-26.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Gerin, J. L., and Purcell, R. H. (1974). Buoyant density of the hepatitis A virus-like particle in cesium chloride. *J Virol* **13**(6), 1412-4.
- Ferrari, E., Wright-Minogue, J., Fang, J. W., Baroudy, B. M., Lau, J. Y., and Hong, Z. (1999). Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli. *Journal of virology* **73**(2), 1649-54.
- Ferraris, P., Blanchard, E., and Roingeard, P. (2010). Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol* **91**(Pt 9), 2230-7.

- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M., and Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4(5), 491-6.
- Flanagan, S. P. (1966). 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 8(3), 295-309.
- Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L. D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S., and McKeating, J. A. (1999). Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 73(8), 6235-44.
- Folgori, A., Capone, S., Ruggeri, L., Meola, A., Sporeno, E., Ercole, B. B., Pezzanera, M., Tafi, R., Arcuri, M., Fattori, E., Lahm, A., Luzzago, A., Vitelli, A., Colloca, S., Cortese, R., and Nicosia, A. (2006). A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* 12(2), 190-7.
- Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., Domergue, J., and Maurel, P. (1998a). In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *Journal of General Virology* 79, 2367-2374.
- Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., Domergue, J., and Maurel, P. (1998b). In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol* 79 (Pt 10), 2367-74.
- Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Johnson, C. L., Wang, C., Fish, P. M., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M., and Gale, M., Jr. (2005). Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(8), 2986-91.
- Frank, C., Mohamed, M. K., Strickland, G. T., Lavanchy, D., Arthur, R. R., Magder, L. S., El Khaby, T., Abdel-Wahab, Y., Aly Ohn, E. S., Anwar, W., and Sallam, I. (2000). The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 355(9207), 887-91.
- Frelin, L., Brenndorfer, E. D., Ahlen, G., Weiland, M., Hultgren, C., Alheim, M., Glaumann, H., Rozell, B., Milich, D. R., Bode, J. G., and Sallberg, M. (2006). The hepatitis C virus and immune evasion: non-structural 3/4A transgenic mice are resistant to lethal tumour necrosis factor alpha mediated liver disease. *Gut* 55(10), 1475-83.
- Fribe, P., Boudet, J., Simorre, J. P., and Bartenschlager, R. (2005). Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* 79(1), 380-92.
- Fribe, P., Lohmann, V., Krieger, N., and Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75(24), 12047-57.
- Fried, M. W., Schiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F. L., Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., and Yu, J. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347(13), 975-82.
- Galun, E., Burakova, T., Ketzinel, M., Lubin, I., Shezen, E., Kahana, Y., Eid, A., Ilan, Y., Rivkind, A., Pizov, G., and et al. (1995). Hepatitis C virus viremia in SCID-->BNX mouse chimera. *J Infect Dis* 172(1), 25-30.
- Gane, E. J., Roberts, S. K., Stedman, C. A., Angus, P. W., Ritchie, B., Elston, R., Ipe, D., Morcos, P. N., Baher, L., Najera, I., Chu, T., Lopatin, U., Berrey, M. M., Bradford, W., Laughlin, M., Shulman, N. S., and Smith, P. F. (2010). Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet* 376(9751), 1467-75.

- Gao, L., Aizaki, H., He, J. W., and Lai, M. M. (2004a). Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of virology* **78**(7), 3480-8.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J. W., and Lai, M. M. (2004b). Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* **78**(7), 3480-8.
- Gao, M., Nettles, R. E., Belema, M., Snyder, L. B., Nguyen, V. N., Fridell, R. A., Serrano-Wu, M. H., Langley, D. R., Sun, J. H., O'Boyle, D. R., 2nd, Lemm, J. A., Wang, C., Knipe, J. O., Chien, C., Colonna, R. J., Grasela, D. M., Meanwell, N. A., and Hamann, L. G. (2010). Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* **465**(7294), 96-100.
- Garber, K. (2007). Hepatitis C: staying the course. *Nat Biotechnol* **25**(12), 1379-81.
- George, M. D., Baba, M., Scott, S. V., Mizushima, N., Garrison, B. S., Ohsumi, Y., and Klionsky, D. J. (2000). Apg5p Functions in the Sequestration Step in the Cytoplasm-to-Vacuole Targeting and Macroautophagy Pathways. *Mol. Biol. Cell* **11**(3), 969-982.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* **77**(9), 5487-92.
- Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K., and Baker, S. C. (2002). RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J Virol* **76**(8), 3697-708.
- Gottwein, J. M., and Bukh, J. (2008). Cutting the gordian knot-development and biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems. In "Advances in Virus Research, Vol 71", Vol. 71, pp. 51-+. Elsevier Academic Press Inc, San Diego.
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1993). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(22), 10583-7.
- Grange, J. D. (2002). [Treatment of acute hepatitis C]. *Gastroenterol Clin Biol* **26 Spec No 2**, B32-7.
- Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P., and Rowlands, D. J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* **535**(1-3), 34-8.
- Grompe, M., Lindstedt, S., al-Dhalimy, M., Kennaway, N. G., Papaconstantinou, J., Torres-Ramos, C. A., Ou, C. N., and Finegold, M. (1995). Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* **10**(4), 453-60.
- Guevin, C., Lamarre, A., and Labonte, P. (2009). Novel HCV replication mouse model using human hepatocellular carcinoma xenografts. *Antiviral Res* **84**(1), 14-22.
- Guevin, C., Manna, D., Belanger, C., Konan, K. V., Mak, P., and Labonte, P. (2010). Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection. *Virology* **405**(1), 1-7.
- Guo, J. T., Sohn, J. A., Zhu, Q., and Seeger, C. (2004). Mechanism of the interferon alpha response against hepatitis C virus replicons. *Virology* **325**(1), 71-81.
- Hadziyannis, S. J., Sette, H., Jr., Morgan, T. R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G., Bodenheimer, H., Jr., Bernstein, D., Rizzetto, M., Zeuzem, S., Pockros, P. J., Lin, A., and Ackrill, A. M. (2004). Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* **140**(5), 346-55.

- Haid, S., Pietschmann, T., and Pecheur, E. I. (2009). Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J Biol Chem* **284**(26), 17657-67.
- Hamamoto, I., Nishimura, Y., Okamoto, T., Aizaki, H., Liu, M., Mori, Y., Abe, T., Suzuki, T., Lai, M. M., Miyamura, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2005). Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *Journal of virology* **79**(21), 13473-82.
- Hammond, E. M., Brunet, C. L., Johnson, G. D., Parkhill, J., Milner, A. E., Brady, G., Gregory, C. D., and Grand, R. J. A. (1998). Homology between a human apoptosis specific protein and the product of APG5, a gene involved in autophagy in yeast. *FEBS Letters* **425**(3), 391-395.
- Hazari, S., Heffler, H. J., Chandra, P. K., Poat, B., Gunduz, F., Ooms, T., Wu, T., Balart, L. A., and Dash, S. (2011). Hepatocellular carcinoma xenograft supports HCV replication: a mouse model for evaluating antivirals. *World J Gastroenterol* **17**(3), 300-12.
- He, C., and Levine, B. (2010). The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol* **22**(2), 140-9.
- Heathcote, E. J., Schiffman, M. L., Cooksley, W. G., Dusheiko, G. M., Lee, S. S., Balart, L., Reindollar, R., Reddy, R. K., Wright, T. L., Lin, A., Hoffman, J., and De Pamphilis, J. (2000). Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med* **343**(23), 1673-80.
- Heckel, J. L., Sandgren, E. P., Degen, J. L., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1990). Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. *Cell* **62**(3), 447-56.
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A. R., Farese, R. V., Jr., and Ott, M. (2010). Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med* **16**(11), 1295-8.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1993a). Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* **67**(8), 4665-75.
- Hijikata, M., Shimizu, Y. K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J. W., Alter, H. J., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1993b). Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* **67**(4), 1953-8.
- Hinrichsen, H., Benhamou, Y., Wedemeyer, H., Reiser, M., Sentjens, R. E., Calleja, J. L., Forns, X., Erhardt, A., Cronlein, J., Chaves, R. L., Yong, C. L., Nehmiz, G., and Steinmann, G. G. (2004). Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology* **127**(5), 1347-55.
- Hinson, E. R., and Cresswell, P. (2009). The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic alpha-helix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(48), 20452-7.
- Hiraga, N., Imamura, M., Abe, H., Nelson Hayes, C., Kono, T., Onishi, M., Tsuge, M., Takahashi, S., Ochi, H., Iwao, E., Kamiya, N., Yamada, I., Tateno, C., Yoshizato, K., Matsui, H., Kanai, A., Inaba, T., Tanaka, S., and Chayama, K. (2011). Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wild type clone in vivo. *Hepatology*.
- Hiraga, N., Imamura, M., Tsuge, M., Noguchi, C., Takahashi, S., Iwao, E., Fujimoto, Y., Abe, H., Maekawa, T., Ochi, H., Tateno, C., Yoshizato, K., Sakai, A., Sakai, Y., Honda, M., Kaneko, S., Wakita, T., and Chayama, K. (2007). Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett* **581**(10), 1983-7.
- Hishiki, T., Shimizu, Y., Tobita, R., Sugiyama, K., Ogawa, K., Funami, K., Ohsaki, Y., Fujimoto, T., Takaku, H., Wakita, T., Baumert, T. F., Miyanari, Y., and Shimotohno, K. (2010).

- Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol* **84**(22), 12048-57.
- Hong, Z., Cameron, C. E., Walker, M. P., Castro, C., Yao, N., Lau, J. Y., and Zhong, W. (2001). A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase. *Virology* **285**(1), 6-11.
- Hoofnagle, J. H., and di Bisceglie, A. M. (1997). The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med* **336**(5), 347-56.
- Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(21), 12027-32.
- Howe, A. Y., Cheng, H., Thompson, I., Chunduru, S. K., Herrmann, S., O'Connell, J., Agarwal, A., Chopra, R., and Del Vecchio, A. M. (2006). Molecular mechanism of a thumb domain hepatitis C virus nonnucleoside RNA-dependent RNA polymerase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(12), 4103-13.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M., and McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12), 7271-6.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D. M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr., and Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14), 5848-53.
- Hunt, S. C., Hopkins, P. N., Bulka, K., McDermott, M. T., Thorne, T. L., Wardell, B. B., Bowen, B. R., Ballinger, D. G., Skolnick, M. H., and Samuels, M. E. (2000). Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(4), 1089-93.
- Ilan, E., Arazi, J., Nussbaum, O., Zauberan, A., Eren, R., Lubin, I., Neville, L., Ben-Moshe, O., Kischitzky, A., Litchi, A., Margalit, I., Gopher, J., Mounir, S., Cai, W., Daudi, N., Eid, A., Jurim, O., Czerniak, A., Galun, E., and Dagan, S. (2002a). The hepatitis C virus (HCV)-Trimer mouse: a model for evaluation of agents against HCV. *J Infect Dis* **185**(2), 153-61.
- Ilan, E., Arazi, J., Nussbaum, O., Zauberan, A., Eren, R., Lubin, I., Neville, L., Ben-Moshe, O., Kischitzky, A., Litchi, A., Margalit, I., Gopher, J., Mounir, S., Cai, W. Z., Daudi, N., Eid, A., Jurim, O., Czerniak, A., Galun, E., and Dagan, S. (2002b). The hepatitis C virus (HCV)-Trimer mouse: A model for evaluation of agents against HCV. *Journal of Infectious Diseases* **185**(2), 153-161.
- Inoue, K., Umehara, T., Ruegg, U. T., Yasui, F., Watanabe, T., Yasuda, H., Dumont, J. M., Scalfaro, P., Yoshioka, M., and Kohara, M. (2007). Evaluation of a cyclophilin inhibitor in hepatitis C virus-infected chimeric mice in vivo. *Hepatology* **45**(4), 921-8.
- Ishida, S., Kaito, M., Kohara, M., Tsukiyama-Kohora, K., Fujita, N., Ikoma, J., Adachi, Y., and Watanabe, S. (2001). Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **20**(3), 335-347.
- Jacobson, I. M., McHutchison, J. G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A. M., Reddy, K. R., Bzowej, N. H., Marcellin, P., Muir, A. J., Ferenci, P., Flisiak, R., George, J., Rizzetto, M., Shouval, D., Sola, R., Terg, R. A., Yoshida, E. M., Adda, N., Bengtsson, L., Sankoh, A. J., Kieffer, T. L., George, S., Kauffman, R. S., and Zeuzem, S. (2011). Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **364**(25), 2405-16.

- Jiang, J., and Luo, G. (2009). Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* **83**(24), 12680-91.
- Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J. Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2010). Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog* **6**(12), e1001233.
- Jones, C. T., Murray, C. L., Eastman, D. K., Tassello, J., and Rice, C. M. (2007). Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* **81**(16), 8374-83.
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**(5740), 1577-81.
- Kamegaya, Y., Hiasa, Y., Zukerberg, L., Fowler, N., Blackard, J. T., Lin, W., Choe, W. H., Schmidt, E. V., and Chung, R. T. (2005). Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **41**(3), 660-7.
- Kamili, S., Krawczynski, K., McCaustland, K., Li, X., and Alter, M. J. (2007). Infectivity of hepatitis C virus in plasma after drying and storing at room temperature. *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**(5), 519-24.
- Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Asabe, S., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1994). Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun* **205**(1), 320-6.
- Kao, J. H., Liu, C. J., Chen, P. J., Chen, W., Lai, M. Y., and Chen, D. S. (2000). Low incidence of hepatitis C virus transmission between spouses: a prospective study. *J Gastroenterol Hepatol* **15**(4), 391-5.
- Kapadia, S. B., and Chisari, F. V. (2005). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(7), 2561-6.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., and Wakita, T. (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* **125**(6), 1808-17.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Mizokami, M., and Wakita, T. (2005). Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *J Virol* **79**(1), 592-6.
- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T., and Wakita, T. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *Journal of Medical Virology* **64**(3), 334-339.
- Kato, T., Matsumura, T., Heller, T., Saito, S., Sapp, R. K., Murthy, K., Wakita, T., and Liang, T. J. (2007). Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J Virol* **81**(9), 4405-11.
- Kawamura, T., Furusaka, A., Koziel, M. J., Chung, R. T., Wang, T. C., Schmidt, E. V., and Liang, T. J. (1997). Transgenic expression of hepatitis C virus structural proteins in the mouse. *Hepatology* **25**(4), 1014-21.
- Khakpoor, A., Panyasrivanit, M., Wikan, N., and Smith, D. R. (2009). A role for autophagolysosomes in dengue virus 3 production in HepG2 cells. *J Gen Virol* **90**(Pt 5), 1093-103.
- Kim, J., Huang, W. P., and Klionsky, D. J. (2001). Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. *J Cell Biol* **152**(1), 51-64.
- Kim, J., and Klionsky, D. J. (2000). Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* **69**, 303-42.

- Kito, M., Matsumoto, K., Wada, N., Sera, K., Futatsugawa, S., Naoe, T., Nozawa, Y., and Akao, Y. (2003). Antitumor effect of arsenic trioxide in murine xenograft model. *Cancer Science* **94**(11), 1010-1014.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., and Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**(4), 539-45.
- Klionsky, D. J., and Emr, S. D. (2000). Cell biology - Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**(5497), 1717-1721.
- Klopstock, N., Katzenellenbogen, M., Pappo, O., Sklair-Levy, M., Olam, D., Mizrahi, L., Potikha, T., Galun, E., and Goldenberg, D. (2009). HCV tumor promoting effect is dependent on host genetic background. *PLoS One* **4**(4), e5025.
- Kneteman, N. M., Howe, A. Y., Gao, T., Lewis, J., Pevear, D., Lund, G., Douglas, D., Mercer, D. F., Tyrrell, D. L., Immermann, F., Chaudhary, I., Speth, J., Villano, S. A., O'Connell, J., and Collett, M. (2009). HCV796: A selective nonstructural protein 5B polymerase inhibitor with potent anti-hepatitis C virus activity in vitro, in mice with chimeric human livers, and in humans infected with hepatitis C virus. *Hepatology* **49**(3), 745-52.
- Kneteman, N. M., Weiner, A. J., O'Connell, J., Collett, M., Gao, T., Aukerman, L., Kovelsky, R., Ni, Z. J., Zhu, Q., Hashash, A., Kline, J., Hsi, B., Schiller, D., Douglas, D., Tyrrell, D. L., and Mercer, D. F. (2006a). Anti-HCV therapies in chimeric scid-Alb/uPA mice parallel outcomes in human clinical application. *Hepatology* **43**(6), 1346-53.
- Kneteman, N. M., Weiner, A. J., O'Connell, J., Collett, M., Gao, T. J., Aukerman, L., Kovelsky, R., Ni, Z. J., Hashash, A., Kline, J., Hsi, B., Schiller, D., Douglas, D., Tyrrell, D. L. J., and Mercer, D. F. (2006b). Anti-HCV therapies in chimeric scid-Alb/uPA mice parallel outcomes in human clinical application. *Hepatology* **43**(6), 1346-1353.
- Koike, K., Moriya, K., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Suzuki, T., Saito, I., Iino, S., Kurokawa, K., and Miyamura, T. (1995). Expression of hepatitis C virus envelope proteins in transgenic mice. *J Gen Virol* **76** (Pt 12), 3031-8.
- Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1997). Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* **277**(5325), 570-4.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* **70**(6), 3363-71.
- Konan, K. V., Giddings, T. H., Jr., Ikeda, M., Li, K., Lemon, S. M., and Kirkegaard, K. (2003). Nonstructural protein precursor NS4A/B from hepatitis C virus alters function and ultrastructure of host secretory apparatus. *J Virol* **77**(14), 7843-55.
- Krieger, N., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2001). Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *Journal of Virology* **75**(10), 4614-4624.
- Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(12), 1004-10.
- Kumar, U., Brown, J., Monjardino, J., and Thomas, H. C. (1993). Sequence variation in the large envelope glycoprotein (E2/NS1) of hepatitis C virus during chronic infection. *J Infect Dis* **167**(3), 726-30.
- Kuntzen, T., Timm, J., Berical, A., Lennon, N., Berlin, A. M., Young, S. K., Lee, B., Heckerman, D., Carlson, J., Reyor, L. L., Kleyman, M., McMahon, C. M., Birch, C., Schulze Zur Wiesch, J., Ledlie, T., Koehrsen, M., Kodira, C., Roberts, A. D., Lauer, G. M., Rosen, H. R., Bihl, F., Cerny, A., Spengler, U., Liu, Z., Kim, A. Y., Xing, Y., Schneidewind, A., Madey, M. A., Fleckenstein, J. F., Park, V. M., Galagan, J. E., Nusbaum, C., Walker, B. D., Lake-Bakaar, G.

- V., Daar, E. S., Jacobson, I. M., Gomperts, E. D., Edlin, B. R., Donfield, S. M., Chung, R. T., Talal, A. H., Marion, T., Birren, B. W., Henn, M. R., and Allen, T. M. (2008). Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology* **48**(6), 1769-78.
- Kwo, P. Y., Lawitz, E. J., McCone, J., Schiff, E. R., Vierling, J. M., Pound, D., Davis, M. N., Galati, J. S., Gordon, S. C., Ravendhran, N., Rossaro, L., Anderson, F. H., Jacobson, I. M., Rubin, R., Koury, K., Pedicone, L. D., Brass, C. A., Chaudhri, E., and Albrecht, J. K. (2010). Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet* **376**(9742), 705-16.
- Kyono, K., Miyashiro, M., and Taguchi, I. (2002). Human eukaryotic initiation factor 4AII associates with hepatitis C virus NS5B protein in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **292**(3), 659-66.
- Labonte, P., Begley, S., Guevin, C., Asselin, M. C., Nassoury, N., Mayer, G., Prat, A., and Seidah, N. G. (2009). PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology* **50**(1), 17-24.
- Labonte, P., Kadhim, S., Bowlin, T., and Mounir, S. (2000a). Inhibition of tumor growth with doxorubicin in a new orthotopically implanted human hepatocellular carcinoma model. *Hepatology Research* **18**(1), 72-85.
- Labonte, P., Kadhim, S., Bowlin, T., and Mounir, S. (2000b). Inhibition of tumor growth with doxorubicin in a new orthotopically implanted human hepatocellular carcinoma model. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **18**(1), 72-85.
- Labonte, P., Morin, N., Bowlin, T., and Mounir, S. (2002a). Basal replication of hepatitis C virus in nude mice harboring human tumor. *J Med Virol* **66**(3), 312-9.
- Labonte, P., Morin, N., Bowlin, T., and Mounir, S. (2002b). Basal replication of hepatitis C virus in nude mice harboring human tumor. *Journal of Medical Virology* **66**(3), 312-319.
- Lam, A. M., and Frick, D. N. (2006). Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *J Virol* **80**(1), 404-11.
- Lamarre, D., Anderson, P. C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P., Bos, M., Cameron, D. R., Cartier, M., Cordingley, M. G., Faucher, A. M., Goudreau, N., Kawai, S. H., Kukolj, G., Lagace, L., LaPlante, S. R., Narjes, H., Poupart, M. A., Rancourt, J., Sentjens, R. E., St George, R., Simoneau, B., Steinmann, G., Thibeault, D., Tsantrizos, Y. S., Weldon, S. M., Yong, C. L., and Llinas-Brunet, M. (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* **426**(6963), 186-9.
- Lanford, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M. E., Kauppinen, S., and Orum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **327**(5962), 198-201.
- Lauer, G. M., and Walker, B. D. (2001). Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* **345**(1), 41-52.
- Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B., Pawlotsky, J. M., and Cosset, F. L. (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**(10), 6023-34.
- Law, M., Maruyama, T., Lewis, J., Giang, E., Tarr, A. W., Stamatakis, Z., Gastaminza, P., Chisari, F. V., Jones, I. M., Fox, R. I., Ball, J. K., McKeating, J. A., Kneteman, N. M., and Burton, D. R. (2008). Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* **14**(1), 25-7.

- Lee, Y. R., Lei, H. Y., Liu, M. T., Wang, J. R., Chen, S. H., Jiang-Shieh, Y. F., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Liu, C. C., and Liu, H. S. (2008a). Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology* **374**(2), 240-248.
- Lee, Y. R., Lei, H. Y., Liu, M. T., Wang, J. R., Chen, S. H., Jiang-Shieh, Y. F., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Liu, C. C., and Liu, H. S. (2008b). Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology* **374**(2), 240-8.
- Lerat, H., Kamoun, H. L., Hainault, I., Merour, E., Higgs, M. R., Callens, C., Lemon, S. M., Foufelle, F., and Pawlotsky, J. M. (2009). Hepatitis C virus proteins induce lipogenesis and defective triglyceride secretion in transgenic mice. *J Biol Chem* **284**(48), 33466-74.
- Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F., and Weber, P. C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nature structural biology* **6**(10), 937-43.
- Li, K., Chen, Z., Kato, N., Gale, M., Jr., and Lemon, S. M. (2005a). Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *J Biol Chem* **280**(17), 16739-47.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M., Jr., and Lemon, S. M. (2005b). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8), 2992-7.
- Li, X., Jeffers, L. J., Shao, L., Reddy, K. R., de Medina, M., Scheffel, J., Moore, B., and Schiff, E. R. (1995). Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. *Journal of viral hepatitis* **2**(5), 227-34.
- Liang, Y., Shilagard, T., Xiao, S. Y., Snyder, N., Lau, D., Cicalese, L., Weiss, H., Vargas, G., and Lemon, S. M. (2009). Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy. *Gastroenterology* **137**(4), 1448-58.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A., and Rice, C. M. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**(5734), 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., and Rice, C. M. (2006). Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10), 3805-9.
- Lindenbach, B. D., and Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* **59**, 23-61.
- Lindenbach, B. D., and Rice, C. M. (2005). Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* **436**(7053), 933-938.
- Lindstedt, S., Holme, E., Lock, E. A., Hjalmarson, O., and Strandvik, B. (1992). Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Lancet* **340**(8823), 813-7.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**(5424), 110-3.
- Longatti, A., and Tooze, S. A. (2009). Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ* **16**(7), 956-65.
- Lorenz, I. C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T. G., and Rice, C. M. (2006). Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **442**(7104), 831-5.
- Lozach, P. Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Foung, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., and

- Altmeyer, R. (2003). DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* **278**(22), 20358-66.
- Luo, G., Hamatake, R. K., Mathis, D. M., Racela, J., Rigat, K. L., Lemm, J., and Colonna, R. J. (2000). De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J Virol* **74**(2), 851-63.
- Luo, J., Deng, Z. L., Luo, X., Tang, N., Song, W. X., Chen, J., Sharff, K. A., Luu, H. H., Haydon, R. C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and He, T. C. (2007). A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* **2**(5), 1236-47.
- Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S. M., and Yi, M. (2008). NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol* **82**(15), 7624-39.
- Maeda, N., Watanabe, M., Okamoto, S., Kanai, T., Yamada, T., Hata, J., Hozumi, N., Katsume, A., Nuriya, H., Sandhu, J., Ishii, H., Kohara, M., and Hibi, T. (2004). Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with an infectious molecular clone. *Liver Int* **24**(3), 259-67.
- Maggi, F., Fornai, C., Morrica, A., Vatteroni, M. L., Giorgi, M., Marchi, S., Ciccorossi, P., Bendinelli, M., and Pistello, M. (1999). Divergent evolution of hepatitis C virus in liver and peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Med Virol* **57**(1), 57-63.
- Majumder, M., Ghosh, A. K., Steele, R., Zhou, X. Y., Phillips, N. J., Ray, R., and Ray, R. B. (2002). Hepatitis C virus NSSA protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis, but not by an anti-FAS antibody, in transgenic mice. *Virology* **294**(1), 94-105.
- Manna, D., Aligo, J., Xu, C., Park, W. S., Koc, H., Heo, W. D., and Konan, K. V. (2010). Endocytic Rab proteins are required for hepatitis C virus replication complex formation. *Virology* **398**(1), 21-37.
- Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z. D., Koury, K., Ling, M., and Albrecht, J. K. (2001). Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **358**(9286), 958-65.
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. (2008). Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* **82**(16), 7964-76.
- Matsushita, M., Suzuki, N. N., Obara, K., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2007). Structure of Atg5.Atg16, a complex essential for autophagy. *J Biol Chem* **282**(9), 6763-72.
- Matsuura, Y., Tani, H., Suzuki, K., Kimura-Someya, T., Suzuki, R., Aizaki, H., Ishii, K., Moriishi, K., Robison, C. S., Whitt, M. A., and Miyamura, T. (2001). Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* **286**(2), 263-75.
- Maxwell, K. N., and Breslow, J. L. (2004). Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(18), 7100-5.
- McHutchison, J. G., Manns, M. P., Muir, A. J., Terrault, N. A., Jacobson, I. M., Afshar, N. H., Heathcote, E. J., Zeuzem, S., Reesink, H. W., Garg, J., Bharat, M., George, S., Kauffman, R. S., Adda, N., and Di Bisceglie, A. M. (2010). Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. *N Engl J Med* **362**(14), 1292-303.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* **21**(15), 3980-8.

- McNutt, M. C., Lagace, T. A., and Horton, J. D. (2007). Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem* **282**(29), 20799-803.
- Meanwell, N. A. (2011). Improving drug candidates by design: a focus on physicochemical properties as a means of improving compound disposition and safety. *Chem Res Toxicol* **24**(9), 1420-56.
- Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., Lakey, J. R., Tyrrell, D. L., and Kneteman, N. M. (2001a). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* **7**(8), 927-33.
- Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C. H., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., Lakey, J. R. T., Tyrrell, D. L. J., and Kneteman, N. M. (2001b). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature Medicine* **7**(8), 927-933.
- Merz, A., Long, G., Hiet, M. S., Brugger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, F., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2011). Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *The Journal of biological chemistry* **286**(4), 3018-32.
- Meuleman, P., Hesselgesser, J., Paulson, M., Vanwolleghem, T., Desombere, I., Reiser, H., and Leroux-Roels, G. (2008). Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* **48**(6), 1761-8.
- Meuleman, P., and Leroux-Roels, G. (2008). The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Res* **80**(3), 231-8.
- Meuleman, P., Libbrecht, L., De Vos, R., de Hemptinne, B., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Roskams, T., and Leroux-Roels, G. (2005). Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology* **41**(4), 847-56.
- Meunier, J. C., Engle, R. E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S. U., Cosset, F. L., Purcell, R. H., and Bukh, J. (2005). Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(12), 4560-5.
- Meunier, J. C., Russell, R. S., Engle, R. E., Faulk, K. N., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. (2008). Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus. *J Virol* **82**(19), 9647-56.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschoopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**(7062), 1167-72.
- Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J. C., Ung, S., Rice, C. M., and Dubuisson, J. (1997). Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* **78** (Pt 9), 2299-306.
- Miller, R. H., and Purcell, R. H. (1990). Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6), 2057-61.
- Miyamoto, H., Okamoto, H., Sato, K., Tanaka, T., and Mishiro, S. (1992). Extraordinarily low density of hepatitis C virus estimated by sucrose density gradient centrifugation and the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* **73** (Pt 3), 715-8.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007a). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology* **9**(9), 1089-U74.

- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007b). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* **9**(9), 1089-97.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**(6700), 395-8.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* **152**(4), 657-68.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Gruber, P., Ghersa, P., Smolarsky, M., Funaro, A., Malavasi, F., Larrey, D., Coste, J., Fabre, J. M., Sa-Cunha, A., and Maurel, P. (2007a). The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *Journal of Hepatology* **46**(3), 411-419.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., Roitelman, J., Barbaras, R., Gruber, P., Ghersa, P., Smolarsky, M., Funaro, A., Malavasi, F., Larrey, D., Coste, J., Fabre, J. M., Sa-Cunha, A., and Maurel, P. (2007b). The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* **46**(3), 411-9.
- Molina, S., Castet, V., Pichard-Garcia, L., Wychowski, C., Meurs, E., Pascussi, J. M., Sureau, C., Fabre, J. M., Sacunha, A., Larrey, D., Dubuisson, J., Coste, J., McKeating, J., Maurel, P., and Fournier-Wirth, C. (2008). Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol* **82**(1), 569-74.
- Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H. E., and Bienz, K. (2003). Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res* **60**(2), 103-9.
- Moriishi, K., Mochizuki, R., Moriya, K., Miyamoto, H., Mori, Y., Abe, T., Murata, S., Tanaka, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Koike, K., and Matsuura, Y. (2007). Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(5), 1661-6.
- Muchmore, E., Popper, H., Peterson, D. A., Miller, M. F., and Lieberman, H. M. (1988). Non-A, non-B hepatitis-related hepatocellular carcinoma in a chimpanzee. *J Med Primatol* **17**(5), 235-46.
- Muller, H. M., Kallinowski, B., Solbach, C., Theilmann, L., Goeser, T., and Pfaff, E. (1994). B-lymphocytes are predominantly involved in viral propagation of hepatitis C virus (HCV). *Arch Virol Suppl* **9**, 307-16.
- Nakano, T., Lau, G. M., Sugiyama, M., and Mizokami, M. (2012). An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. *Liver Int* **32**(2), 339-45.
- Neddermann, P., Quintavalle, M., Di Pietro, C., Clementi, A., Cerretani, M., Altamura, S., Bartholomew, L., and De Francesco, R. (2004). Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J Virol* **78**(23), 13306-14.
- Nettles, R. E., Gao, M., Bifano, M., Chung, E., Persson, A., Marbury, T. C., Goldwater, R., Demicco, M. P., Rodriguez-Torres, M., Vutikullird, A., Fuentes, E., Lawitz, E., Carlos Lopez-Talavera, J., and Grasela, D. M. (2011). Multiple ascending dose study of BMS-790052, an NS5A

- replication complex inhibitor, in patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatology*.
- Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J., and Perelson, A. S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**(5386), 103-7.
- Nielsen, S. U., Bassendine, M. F., Burt, A. D., Martin, C., Pumeechockchai, W., and Toms, G. L. (2006). Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* **80**(5), 2418-28.
- Osburn, W. O., Fisher, B. E., Dowd, K. A., Urban, G., Liu, L., Ray, S. C., Thomas, D. L., and Cox, A. L. (2010). Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* **138**(1), 315-24.
- Osna, N. A., Thomes, P. G., and Jr, T. M. (2011). Involvement of autophagy in alcoholic liver injury and hepatitis C pathogenesis. *World J Gastroenterol* **17**(20), 2507-14.
- Otsuka, M., Kato, N., Moriyama, M., Taniguchi, H., Wang, Y., Dharel, N., Kawabe, T., and Omata, M. (2005). Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* **41**(5), 1004-12.
- Otto, G. A., and Puglisi, J. D. (2004). The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* **119**(3), 369-80.
- Panyasrivanit, M., Khakpoor, A., Wikan, N., and Smith, D. R. (2009). Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *J Gen Virol* **90**(Pt 2), 448-56.
- Parent, R., Qu, X., Petit, M. A., and Beretta, L. (2009). The heat shock cognate protein 70 is associated with hepatitis C virus particles and modulates virus infectivity. *Hepatology* **49**(6), 1798-809.
- Park, C. Y., Jun, H. J., Wakita, T., Cheong, J. H., and Hwang, S. B. (2009). Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J Biol Chem* **284**(14), 9237-46.
- Pasquinelli, C., Shoenberger, J. M., Chung, J., Chang, K. M., Guidotti, L. G., Selby, M., Berger, K., Lesniewski, R., Houghton, M., and Chisari, F. V. (1997). Hepatitis C virus core and E2 protein expression in transgenic mice. *Hepatology* **25**(3), 719-27.
- Patel, J., Patel, A. H., and McLauchlan, J. (2001). The transmembrane domain of the hepatitis C virus E2 glycoprotein is required for correct folding of the E1 glycoprotein and native complex formation. *Virology* **279**(1), 58-68.
- Pavlovic, D., Neville, D. C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R. A., Fischer, W. B., and Zitzmann, N. (2003). The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10), 6104-8.
- Pedersen, K. W., van der Meer, Y., Roos, N., and Snijder, E. J. (1999). Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *Journal of Virology* **73**(3), 2016-2026.
- Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H. E., Bartenschlager, R., and Moradpour, D. (2004). Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* **279**(39), 40835-43.
- Petit, J. M., Benichou, M., Duvillard, L., Jooste, V., Bour, J. B., Minello, A., Verges, B., Brun, J. M., Gambert, P., and Hillon, P. (2003). Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *The American journal of gastroenterology* **98**(5), 1150-4.

- Pflugheber, J., Fredericksen, B., Sumpter, R., Jr., Wang, C., Ware, F., Sodora, D. L., and Gale, M., Jr. (2002). Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7), 4650-5.
- Pham, T. N., Macparland, S. A., Coffin, C. S., Lee, S. S., Bursey, F. R., and Michalak, T. I. (2005). Mitogen-induced upregulation of hepatitis C virus expression in human lymphoid cells. *J Gen Virol* **86**(Pt 3), 657-66.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., and Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**(5390), 938-41.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P., and Rice, C. M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**(7231), 882-6.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., and Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* **8**(12), 3867-74.
- Podevin, P., Carpentier, A., Pene, V., Aoudjehane, L., Carriere, M., Zaidi, S., Hernandez, C., Calle, V., Meritet, J. F., Scatton, O., Dreux, M., Cosset, F. L., Wakita, T., Bartenschlager, R., Demignot, S., Conti, F., Rosenberg, A. R., and Calmus, Y. (2010). Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* **139**(4), 1355-64.
- Polish, L. B., Tong, M. J., Co, R. L., Coleman, P. J., and Alter, M. J. (1993). Risk factors for hepatitis C virus infection among health care personnel in a community hospital. *Am J Infect Control* **21**(4), 196-200.
- Prentice, E., Jerome, W. G., Yoshimori, T., Mizushima, N., and Denison, M. R. (2004). Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **279**(11), 10136-10141.
- Quinkert, D., Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2005). Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol* **79**(21), 13594-605.
- Rashid, S., Curtis, D. E., Garuti, R., Anderson, N. N., Bashmakov, Y., Ho, Y. K., Hammer, R. E., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2005). Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(15), 5374-9.
- Rautou, P. E., Mansouri, A., Lebrec, D., Durand, F., Valla, D., and Moreau, R. (2010). Autophagy in liver diseases. *J Hepatol* **53**(6), 1123-34.
- Reggiori, F. (2006). 1. Membrane origin for autophagy. *Curr Top Dev Biol* **74**, 1-30.
- Reiser, M., Hinrichsen, H., Benhamou, Y., Reesink, H. W., Wedemeyer, H., Avendano, C., Riba, N., Yong, C. L., Nehmiz, G., and Steinmann, G. G. (2005). Antiviral efficacy of NS3-serine protease inhibitor BILN-2061 in patients with chronic genotype 2 and 3 hepatitis C. *Hepatology* **41**(4), 832-5.
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M. S., Longerich, T., Diehl, S., Ramirez, F., Balla, T., Rohr, K., Kaul, A., Buhler, S., Pepperkok, R., Lengauer, T., Albrecht, M., Eils, R., Schirmacher, P., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2011). Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NSSA is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* **9**(1), 32-45.
- Rhim, J. A., Sandgren, E. P., Degen, J. L., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1994). Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* **263**(5150), 1149-52.
- Rhim, J. A., Sandgren, E. P., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1995). Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11), 4942-6.
- Rice, C. M. (1999). Is CD81 the key to hepatitis C virus entry? *Hepatology* **29**(3), 990-2.

- Rice, C. M., and Lindenbach, B. D. (2001). Flaviviridae. In *Fields Virology*(4th edn), 991-1041.
- Rocha-Perugini, V., Montpellier, C., Delgrange, D., Wychowski, C., Helle, F., Pillez, A., Drobecq, H., Le Naour, F., Charrin, S., Levy, S., Rubinstein, E., Dubuisson, J., and Cocquerel, L. (2008). The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS One* **3**(4), e1866.
- Rollier, C. S., Paranhos-Baccala, G., Verschoor, E. J., Verstrepen, B. E., Drexhage, J. A., Fagrouch, Z., Berland, J. L., Komurian-Pradel, F., Duverger, B., Himoudi, N., Staib, C., Meyr, M., Whelan, M., Whelan, J. A., Adams, V. C., Larrea, E., Riezu, J. I., Lasarte, J. J., Bartosch, B., Cosset, F. L., Spaan, W. J., Diepolder, H. M., Pape, G. R., Sutter, G., Inchauspe, G., and Heeney, J. L. (2007). Vaccine-induced early control of hepatitis C virus infection in chimpanzees fails to impact on hepatic PD-1 and chronicity. *Hepatology* **45**(3), 602-13.
- Sainz, B., Jr., Barretto, N., and Uprichard, S. L. (2009). Hepatitis C virus infection in phenotypically distinct Huh7 cell lines. *PLoS One* **4**(8), e6561.
- Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20), 11646-51.
- Sandgren, E. P., Palmiter, R. D., Heckel, J. L., Daugherty, C. C., Brinster, R. L., and Degen, J. L. (1991). Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* **66**(2), 245-56.
- Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G., and Monica, N. (1995). The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol* **69**(12), 7461-71.
- Sarbah, S. A., and Younossi, Z. M. (2000). Hepatitis C: An update on the silent epidemic (vol 31, pg 125, 2000). *Journal of Clinical Gastroenterology* **31**(1), 79-79.
- Sarhan, M. A., Pham, T. N., Chen, A. Y., and Michalak, T. I. (2012). Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5. *J Virol* **86**(7), 3723-35.
- Saxena, V., Lai, C. K., Chao, T. C., Jeng, K. S., and Lai, M. M. (2012). Annexin A2 is involved in the formation of hepatitis C virus replication complex on the lipid raft. *J Virol*.
- Sbardellati, A., Scarselli, E., Verschoor, E., De Tomasi, A., Lazzaro, D., and Traboni, C. (2001). Generation of infectious and transmissible virions from a GB virus B full-length consensus clone in tamarins. *J Gen Virol* **82**(Pt 10), 2437-48.
- Scarselli, E., Ansini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* **21**(19), 5017-25.
- Schlegel, A., Giddings, T. H., Jr., Ladinsky, M. S., and Kirkegaard, K. (1996). Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* **70**(10), 6576-88.
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and 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**(3), 928-33.
- Sen, G. C. (2001). Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* **55**, 255-81.
- Seth, R. B., Sun, L., and Chen, Z. J. (2006). Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res* **16**(2), 141-7.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., and Chen, Z. J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**(5), 669-82.

- Shi, S. T., Lee, K. J., Aizaki, H., Hwang, S. B., and Lai, M. M. (2003). Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *J Virol* **77**(7), 4160-8.
- Shimizu, Y. K., Weiner, A. J., Rosenblatt, J., Wong, D. C., Shapiro, M., Popkin, T., Houghton, M., Alter, H. J., and Purcell, R. H. (1990). Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(16), 6441-4.
- Shoukry, N. H., Sidney, J., Sette, A., and Walker, C. M. (2004a). Conserved hierarchy of helper T cell responses in a chimpanzee during primary and secondary hepatitis C virus infections. *Journal of Immunology* **172**(1), 483-492.
- Shoukry, N. H., Sidney, J., Sette, A., and Walker, C. M. (2004b). Conserved hierarchy of helper T cell responses in a chimpanzee during primary and secondary hepatitis C virus infections. *J Immunol* **172**(1), 483-92.
- Simmonds, P. (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* **85**(Pt 11), 3173-88.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I. T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J., and Widell, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**(4), 962-73.
- Sir, D., Ann, D. K., and Ou, J. H. (2010). Autophagy by hepatitis B virus and for hepatitis B virus. *Autophagy* **6**(4).
- Sir, D., Tian, Y., Chen, W. L., Ann, D. K., Yen, T. S., and Ou, J. H. (2010). The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(9), 4383-8.
- Sklan, E. H., Staschke, K., Oakes, T. M., Elazar, M., Winters, M., Aroeti, B., Danieli, T., and Glenn, J. S. (2007). A Rab-GAP TBC domain protein binds hepatitis C virus NSSA and mediates viral replication. *Journal of virology* **81**(20), 11096-105.
- Steinman, R. M., and Hemmi, H. (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **311**, 17-58.
- Steinmann, E., and Pietschmann, T. (2010). Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* **2**(9), 2078-95.
- Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V., and Hemler, M. E. (2001). EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem* **276**(44), 40545-54.
- Stone, M., Jia, S., Heo, W. D., Meyer, T., and Konan, K. V. (2007). Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. *J Virol* **81**(9), 4551-63.
- Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Supekova, L., Thimme, R., Wieland, S., Bukh, J., Purcell, R. H., Schultz, P. G., and Chisari, F. V. (2002). Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24), 15669-74.
- Suhy, D. A., Giddings, T. H., and Kirkegaard, K. (2000). Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *Journal of Virology* **74**(19), 8953-8965.
- Szabo, G., and Dolganiuc, A. (2005). Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. *Immunobiology* **210**(2-4), 237-47.
- Taguchi, T., Nagano-Fujii, M., Akutsu, M., Kadoya, H., Ohgimoto, S., Ishido, S., and Hotta, H. (2004). Hepatitis C virus NSSA protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J Gen Virol* **85**(Pt 4), 959-69.

- Tanaka, N., Moriya, K., Kiyosawa, K., Koike, K., Gonzalez, F. J., and Aoyama, T. (2008). PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *J Clin Invest* **118**(2), 683-94.
- Tanida, I., Fukasawa, M., Ueno, T., Kominami, E., Wakita, T., and Hanada, K. (2009). Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy* **5**(7), 937-45.
- Targett-Adams, P., Boulant, S., and McLauchlan, J. (2008). Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **82**(5), 2182-95.
- Targett-Adams, P., Hope, G., Boulant, S., and McLauchlan, J. (2008). Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem* **283**(24), 16850-9.
- Taylor, D. R., Puig, M., Darnell, M. E., Mihalik, K., and Feinstone, S. M. (2005). New antiviral pathway that mediates hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. *J Virol* **79**(10), 6291-8.
- Taylor, M. P., Burgon, T. B., Kirkegaard, K., and Jackson, W. T. (2009). Role of microtubules in extracellular release of poliovirus. *J Virol* **83**(13), 6599-609.
- Taylor, M. P., and Kirkegaard, K. (2007). Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *J Virol* **81**(22), 12543-53.
- Tellinghuisen, T. L., Evans, M. J., von Hahn, T., You, S., and Rice, C. M. (2007). Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol* **81**(17), 8853-67.
- Thaler, M. M., Park, C. K., Landers, D. V., Wara, D. W., Houghton, M., Veereman-Wauters, G., Sweet, R. L., and Han, J. H. (1991). Vertical transmission of hepatitis C virus. *Lancet* **338**(8758), 17-8.
- Thimme, R., Bukh, J., Spangenberg, H. C., Wieland, S., Pemberton, J., Steiger, C., Govindarajan, S., Purcell, R. H., and Chisari, F. V. (2002). Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(24), 15661-15668.
- Thimme, R., Lohmann, V., and Weber, F. (2006). A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Res* **69**(3), 129-41.
- Thomas, D. L., Astemborski, J., Rai, R. M., Anania, F. A., Schaeffer, M., Galai, N., Nolt, K., Nelson, K. E., Strathdee, S. A., Johnson, L., Laeyendecker, O., Boitnott, J., Wilson, L. E., and Vlahov, D. (2000). The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA* **284**(4), 450-6.
- Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S. I., Alexander, G., Goedert, J. J., Kirk, G. D., Donfield, S. M., Rosen, H. R., Tobler, L. H., Busch, M. P., McHutchison, J. G., Goldstein, D. B., and Carrington, M. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* **461**(7265), 798-801.
- Thurner, C., Witwer, C., Hofacker, I. L., and Stadler, P. F. (2004). Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J Gen Virol* **85**(Pt 5), 1113-24.
- Tian, Y., Sir, D., Kuo, C. F., Ann, D. K., and Ou, J. H. (2011). Autophagy required for hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* **85**(24), 13453-6.
- Timpe, J. M., Stamatakis, Z., Jennings, A., Hu, K., Farquhar, M. J., Harris, H. J., Schwarz, A., Desombere, I., Roels, G. L., Balfe, P., and McKeating, J. A. (2008). Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* **47**(1), 17-24.
- Tong, M. J., and el-Farra, N. S. (1996). Clinical sequelae of hepatitis C acquired from injection drug use. *West J Med* **164**(5), 399-404.

- Triyatni, M., Saunier, B., Maruvada, P., Davis, A. R., Ulianich, L., Heller, T., Patel, A., Kohn, L. D., and Liang, T. J. (2002). Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. *J Virol* **76**(18), 9335-44.
- Troesch, M., Jalbert, E., Canobio, S., Boulassel, M. R., Routy, J. P., Bernard, N. F., Bruneau, J., Lapointe, N., Boucher, M., and Soudeyns, H. (2005). Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *AIDS* **19**(8), 775-84.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66**(3), 1476-83.
- Tu, H., Gao, L., Shi, S. T., Taylor, D. R., Yang, T., Mircheff, A. K., Wen, Y., Gorbalenya, A. E., Hwang, S. B., and Lai, M. M. (1999). Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* **263**(1), 30-41.
- Vaillancourt, F. H., Pilote, L., Cartier, M., Lippens, J., Liuzzi, M., Bethell, R. C., Cordingley, M. G., and Kukolj, G. (2009). Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* **387**(1), 5-10.
- Vanwolleghem, T., Bukh, J., Meuleman, P., Desombere, I., Meunier, J. C., Alter, H., Purcell, R. H., and Leroux-Roels, G. (2008). Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver-chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain. *Hepatology* **47**(6), 1846-55.
- Vanwolleghem, T., Meuleman, P., Libbrecht, L., Roskams, T., De Vos, R., and Leroux-Roels, G. (2007). Ultra-rapid cardiotoxicity of the hepatitis C virus protease inhibitor BILN 2061 in the urokinase-type plasminogen activator mouse. *Gastroenterology* **133**(4), 1144-55.
- Varaklioti, A., Vassilaki, N., Georgopoulou, U., and Mavromara, P. (2002). Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* **277**(20), 17713-21.
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J., and Vu-Dac, N. (2005). High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* **280**(9), 7793-9.
- von Hahn, T., Lindenbach, B. D., Boullier, A., Quehenberger, O., Paulson, M., Rice, C. M., and McKeating, J. A. (2006). Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology* **43**(5), 932-42.
- Wagoner, J., Austin, M., Green, J., Imaizumi, T., Casola, A., Brasier, A., Khabar, K. S., Wakita, T., Gale, M., Jr., and Polyak, S. J. (2007). Regulation of CXCL-8 (interleukin-8) induction by double-stranded RNA signaling pathways during hepatitis C virus infection. *J Virol* **81**(1), 309-18.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., and Liang, T. J. (2005a). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**(7), 791-6.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z. J., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., and Liang, T. J. (2005b). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* **11**(7), 791-796.
- Walters, K. A., Joyce, M. A., Thompson, J. C., Smith, M. W., Yeh, M. M., Proll, S., Zhu, L. F., Gao, T. J., Kneteman, N. M., Tyrrell, D. L., and Katze, M. G. (2006). Host-specific response to HCV infection in the chimeric SCID-beige/Alb-uPA mouse model: role of the innate antiviral immune response. *PLoS Pathog* **2**(6), e59.

- Wang, C., Gale, M., Jr., Keller, B. C., Huang, H., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Ye, J. (2005). Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Molecular cell* **18**(4), 425-34.
- Wang, C., Pflugheber, J., Sumpter, R., Jr., Sodora, D. L., Hui, D., Sen, G. C., and Gale, M., Jr. (2003). Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **77**(7), 3898-912.
- Washburn, M. L., Bility, M. T., Zhang, L., Kovalev, G. I., Buntzman, A., Frelinger, J. A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C. M., and Su, L. (2011). A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* **140**(4), 1334-44.
- Welte, M. A. (2009). Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets. *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 5), 991-6.
- Witteveldt, J., Evans, M. J., Bitzegeio, J., Koutsoudakis, G., Owsianka, A. M., Angus, A. G., Keck, Z. Y., Foung, S. K., Pietschmann, T., Rice, C. M., and Patel, A. H. (2009). CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J Gen Virol* **90**(Pt 1), 48-58.
- Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B. M., and Luo, H. (2008). Autophagosome Supports Coxsackievirus B3 Replication in Host Cells. *Journal of Virology* **82**(18), 9143-9153.
- Wozniak, A. L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S. M., and Weinman, S. A. (2010). Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog* **6**(9), e1001087.
- Wu, G. Y., Konishi, M., Walton, C. M., Olive, D., Hayashi, K., and Wu, C. H. (2005). A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* **128**(5), 1416-23.
- Xu, Z., Choi, J., Yen, T. S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M. J., and Ou, J. (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* **20**(14), 3840-8.
- Yanagi, M., St Claire, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Bukh, J. (1999). In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5), 2291-5.
- Yanagi, M., St Claire, M., Shapiro, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Bukh, J. (1998). Transcripts of a chimeric cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1b are infectious in vivo. *Virology* **244**(1), 161-72.
- Yang, G., Pevear, D. C., Collett, M. S., Chunduru, S., Young, D. C., Benetatos, C., and Jordan, R. (2004). Newly synthesized hepatitis C virus replicon RNA is protected from nuclease activity by a protease-sensitive factor(s). *J Virol* **78**(18), 10202-5.
- Ye, J., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Gale, M., Jr. (2003). Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26), 15865-70.
- Yeo, A. E., Ghany, M., Conry-Cantilena, C., Melpolder, J. C., Kleiner, D. E., Shih, J. W., Hoofnagle, J. H., and Alter, H. J. (2001). Stability of HCV-RNA level and its lack of correlation with disease severity in asymptomatic chronic hepatitis C virus carriers. *J Viral Hepat* **8**(4), 256-63.
- Yi, M., Villanueva, R. A., Thomas, D. L., Wakita, T., and Lemon, S. M. (2006a). Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7), 2310-5.
- Yi, M., Villanueva, R. A., Thomas, D. L., Wakita, T., and Lemon, S. M. (2006b). Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human

- hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(7), 2310-2315.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**(7), 730-7.
- You, S., Stump, D. D., Branch, A. D., and Rice, C. M. (2004). A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **78**(3), 1352-66.
- Yu, G. Y., Lee, K. J., Gao, L., and Lai, M. M. (2006). Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol* **80**(12), 6013-23.
- Zeisel, M. B., Fofana, I., Fafi-Kremer, S., and Baumert, T. F. (2011). Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J Hepatol* **54**(3), 566-76.
- Zhang, Z., Harris, D., and Pandey, V. N. (2008). The FUSE binding protein is a cellular factor required for efficient replication of hepatitis C virus. *Journal of virology* **82**(12), 5761-73.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T., and Chisari, F. V. (2005a). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(26), 9294-9.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G. F., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T., and Chisari, F. V. (2005b). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(26), 9294-9299.
- Zhong, W., Uss, A. S., Ferrari, E., Lau, J. Y., and Hong, Z. (2000). De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *Journal of virology* **74**(4), 2017-22.
- Zhu, Q., Oei, Y., Mendel, D. B., Garrett, E. N., Patawaran, M. B., Hollenbach, P. W., Aukerman, S. L., and Weiner, A. J. (2006a). Novel robust hepatitis C virus mouse efficacy model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**(10), 3260-3268.
- Zhu, Q., Oei, Y., Mendel, D. B., Garrett, E. N., Patawaran, M. B., Hollenbach, P. W., Aukerman, S. L., and Weiner, A. J. (2006b). Novel robust hepatitis C virus mouse efficacy model. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(10), 3260-8.

11 Publications et communications scientifiques

Fahmy A, Duguay C, Guévin C, Bélanger C, Labonté P. Autophagy is required for hepatitis C virus replication in Huh7 cells. (En préparation) 2012

Guévin C, Manna D, Bélanger C, Konan KV, Mak P, Labonté P. Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection. *Virology*. 2010 Sep 15;405(1):1-7

Guévin C, Lamarre A, Labonté P. Novel HCV replication mouse model using human hepatocellular carcinoma xenografts. *Antiviral Res*. 2009 Oct;84(1):14-22

Labonté P, Begley S, **Guévin C**, Asselin MC, Nassoury N, Mayer G, Prat A, Seidah NG. PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology*. 2009 Jul;50 (1):17-24.

Guévin C, Bougie V, Labonté P. 2005
Développement d'un modèle murin pour l'étude de la réPLICATION du virus de l'hépatite C
Congrès IAF 2005
Auberge du Lac-à-l'Eau-Claire, St-Alexis-des-Monts, Qc

Guévin C, Lamarre A, Labonté P. 2007
Development of a xenograft mouse model for HCV infection
14th international symposium on hepatitis C virus and related virus
Glasgow, Scotland UK

Guévin C, Lamarre A, Labonté P. 2007
Développement d'un modèle de xénogreffe murin pour l'étude de l'infection du virus de l'hépatite C
Congrès IAF 2007
Hôtel Chéribourg, Magog-Orford, Qc

Guévin C, Lamarre A, Labonté P. 2009
Novel HCV replication mouse model using human hepatocellular carcinoma xenograft.
22th International conference on Antiviral research (ICAR)
Miami, Floride, U.S.A.

Fahmy A, Duguay C, **Guévin C**, Bélanger C, Labonté P. 2011
Autophagy is required for hepatitis C virus replication in Huh7 cells.
Keystons symposia (Autophagy)
Whistler, British Columbia, Canada