

Université de Montréal

**Mécanismes de Subversion de l'Immunité Innée par le  
Virus de l'Hépatite C (VHC)**

par

Loubna Jouan

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae ès Doctor (Ph.D.)  
en sciences biomédicales

Avril 2010

© Loubna Jouan, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Mécanismes de Subversion de l'Immunité Innée par le virus de l'hépatite C (VHC)

Présentée par :  
Loubna Jouan

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Hugo Soudeyns, président-rapporteur  
Dr Daniel Lamarre, directeur de recherche  
Dr Jacques Archambault, membre du jury  
Dr Éliane Meurs, examinateur externe  
Dr Normand Lapointe, représentant du doyen de la FES

## RÉSUMÉ

L'hépatite C pose un problème de santé publique majeur, dans la mesure où le risque de développer une infection chronique est relativement élevé (40 à 60%) et où la résistance au traitement de choix - l'interféron alpha pégylé et la ribavirine - touche près de la moitié des patients. Cette persistance virale repose avant tout sur de puissantes stratégies d'évasion du système immunitaire inné de l'hôte par le virus. Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la réponse antivirale dans des hépatocytes primaires humains normaux et chroniquement infectés avec le VHC, un domaine encore largement inconnu dû à la difficulté d'obtenir ce type de matériel primaire. Nous avons étudié la fonctionnalité de deux voies majeures de détection des pathogènes viraux suite à l'exposition d'hépatocytes primaires humains à de l'ARNdb intracellulaire, via le récepteur et adaptateur RIG-I/MDA5-CARDIF, et extracellulaire via TLR3-TRIF, mimant ainsi les étapes précoces de la détection d'un virus par la cellule hôte. Nous avons établi par RT-PCR quantitatif et analyse transcriptomique par microarray, que ces deux voies de stimulation sont fonctionnelles dans des hépatocytes primaires normaux et que leur activation entraîne à la fois l'expression de gènes antiviraux communs (*ISG56*, *ISG15*, *CXCL10*, ...) mais aussi spécifiques avec les gènes *IL28A*, *IL28B* et *IL29* qui sont une signature de l'activation de la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire. La protéine virale NS3/4A joue un rôle majeur à la fois dans le clivage de la polyprotéine virale initiale, mais aussi en interférant avec les cascades de signalisation engagées suite à la détection par la cellule hôte de l'ARN du VHC. Plus particulièrement, nous avons démontré que l'expression ectopique de NS3/4A dans des hépatocytes primaires humains normaux entraîne une diminution significative de l'induction des gènes antiviraux due au clivage de CARDIF au cours de l'activation de la voie de signalisation médiée par RIG-I. Nous avons également démontré que l'expression de la NS3/4A entraîne des modifications de l'expression de gènes-clé impliqués dans la régulation de l'apoptose et du programme de mort cellulaire, en particulier lorsque la voie TLR3 est induite. L'ensemble de ces effets sont abolis en présence de BILN2061, inhibiteur spécifique de NS3/4A. Malgré les stratégies de subversion de l'immunité innée par le VHC, nous avons démontré l'induction significative de plusieurs ISGs et chemokines dans des hépatocytes primaires provenant de patients chroniquement infectés avec le VHC, sans toutefois détecter d'interférons de type I, III ou certains gènes antiviraux précoces comme *CCL5*. Ces observations, concomitantes avec une diminution de l'expression de CARDIF et une corrélation inverse entre les niveaux d'ARNm des ISGs et l'ARN viral révèlent une réponse antivirale partielle due à des mécanismes interférents sous-jacents. Cette réponse antivirale détectable mais inefficace est à mettre en lien avec l'échec du traitement classique PEG-IFN-ribavirine chez la moitié des

patients traités, mais aussi en lien avec l'inflammation chronique et les dommages hépatiques qui mènent ultimement au développement d'une fibrose puis d'une cirrhose chez une grande proportion de patients chroniquement infectés.

**Mots-clés** : virus de l'hépatite C, hépatocytes primaires, NS3/4A, ISGs (Interferon Stimulated Genes), interférence virale.

## ABSTRACT

Hepatitis C infection is a worldwide health problem since the risk to develop a persistent infection is relatively elevated (40 to 60%) and nearly half of the infected patients do not respond to the classical anti-HCV therapy based on a combination of PEG-IFN $\alpha$  and ribavirin. Viral persistence is based on powerful evasion strategies of the host's innate immune system. In our study, we characterized antiviral response in primary human normal and chronically HCV-infected hepatocytes, a cutting-edge in our field due to the difficulty to isolate this particular cell type. In order to better define the antiviral response in freshly isolated human primary hepatocytes, we stimulated these cells with extracellular and intracellular dsRNA to trigger TLR3/TRIF and RIG-I-MDA5/CARDIF-mediated antiviral signaling pathways. By using qRT-PCR and microarray analysis, we report that both detection pathways are functional in normal human hepatocytes, their activation leading to the expression of both common (*IFIT1*, *OASL*, *ISG15* and *CXCL10*) and specific genes (*IL28A*, *IL28B* and *IL29*), these last ones being a signature of the intracellular dsRNA-mediated pathway. HCV NS3/4A plays a key role in the viral polyprotein processing and upon viral RNA detection by interfering with the host's antiviral signalling cascades. We report that major antiviral genes induction following activation of RIG-I mediated pathway are severely impaired in ectopically NS3/4A expressing normal hepatocytes due to CARDIF cleavage, but can be restored by specific NS3/4A inhibitor BILN2061. Our microarray analysis also revealed a role for NS3/4A following TLR3-mediated pathway activation on regulation of apoptosis and programmed cell death, which could be linked to strategies for the virus to persist in its host. Despite HCV strategies to circumvent the host's immune defense system, we observed significant upregulation of ISGs and chemokines in liver biopsies and corresponding isolated hepatocytes from chronically HCV-infected patients. However, no type I and III interferon, neither key-antiviral genes (e.g., *CCL5*) were detected, underlying an ongoing –but inefficient- antiviral response unable to eradicate the virus. Moreover, we obtained significant inverse correlations between ISGs mRNAs and viral RNA in addition to CARDIF decrease, clearly unravelling efficient viral interfering strategies in a context of chronic HCV infection. This sustained –albeit incomplete- hepatic innate immune response is certainly associated to the failure of the classical IFN-based therapy in half of the infected patients and to the chronic inflammation causing liver damages and eventually leading to hepatocarcinoma which is often observed at late stage of the disease.

**Keywords:** hepatitis C virus, primary hepatocytes, NS3/4A, ISGs (Interferon Stimulated Genes), viral interference.

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	i
ABSTRACT .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xvi
LISTE DES PUBLICATIONS .....	xxi
REMERCIEMENTS.....	xxv
CHAPITRE 1: Introduction .....	1
1 Immunité innée antivirale .....	2
1.1 Présentation .....	2
1.2 La réponse antivirale .....	3
1.2.1 Les interférons : des effecteurs puissants de la réponse antivirale.....	3
1.2.1.1 Les interférons de type I .....	4
1.2.1.2 L'interféron de type II.....	5
1.2.1.3 Les interférons de type III.....	5
1.2.2 IRFs et NFκB : facteurs de transcription-clé des interférons .....	5
1.2.2.1 Les IRFs.....	5
1.2.2.2 NFκB.....	7
1.2.3 Contrôle transcriptionnel des interférons de type I .....	9
1.2.4 La voie classique des interférons.....	10
1.2.5 La réponse antivirale précoce : bref survol .....	11
1.2.5.1 Modèle proposé.....	11
1.2.5.2 Quelques gènes antiviraux et leur fonction.....	12
1.3 Reconnaissance des pathogènes viraux par l'hôte et voies de signalisation.....	14
1.3.1 Rôle et grandes catégories de PRRs .....	14
1.3.2 L'ARN comme signature d'une infection virale .....	16
1.3.3 Les TLRs antiviraux.....	17
1.3.3.1 Présentation.....	17
1.3.3.2 Les TLR7, 8 et 9 .....	18
1.3.3.2.1 Définitions et ligands.....	18

1.3.3.2.2	Voie de signalisation .....	19
1.3.3.3	Le TLR3.....	20
1.3.3.3.1	Rôle et structure.....	20
1.3.3.3.2	Localisation .....	22
1.3.3.3.3	Voie de signalisation .....	23
1.3.4	Les récepteurs intracellulaires de la famille des RLHs .....	26
1.3.4.1	Présentation et caractéristiques structurales.....	26
1.3.4.2	RIG-I: activation et spécificité de ligand .....	28
1.3.4.2.1	Mécanisme d'activation.....	28
1.3.4.2.2	Ligands .....	30
1.3.4.3	MDA5 : spécificité de ligand.....	31
1.3.4.4	RIG-I et MDA5 : Voie de signalisation .....	32
1.3.5	PKR .....	35
1.3.6	Les régulateurs négatifs des voies de signalisation .....	36
1.3.6.1	Ubiquitination et déubiquitination.....	36
1.3.6.2	Autres exemples de régulateurs négatifs.....	37
2.	Le Virus de l'Hépatite C .....	39
2.1	Les grandes lignes de l'infection avec le VHC.....	39
2.1.1	Données épidémiologiques .....	39
2.1.2	Histoire naturelle de la maladie.....	40
2.1.3	Dynamique de l'infection.....	41
2.2	Structure génomique et protéines du VHC .....	42
2.2.1	Le génome du VHC.....	42
2.2.2	Les protéines structurales du VHC.....	43
2.2.3	Les protéines non-structurales du VHC .....	46
2.2.3.1	NS2 .....	46
2.2.3.2	NS3 .....	46
2.2.3.3	NS4A .....	47
2.2.3.4	NS4B.....	48
2.2.3.5	NS5A .....	48
2.2.3.6	NS5B.....	48
2.3	Le cycle viral du VHC.....	50
2.3.1	L'entrée du virus .....	50
2.3.2	La traduction et la réplication.....	51

2.3.3 Assemblage et relâchement .....	52
2.4 Modèles d'étude du VHC .....	53
2.4.1 Le concept du génome consensus et ses limites .....	54
2.4.2 Premier clone infectieux <i>in vitro</i> : JFH1 .....	55
2.4.3 La permissivité des cellules au VHC .....	57
2.4.4 Les modèles animaux .....	59
3 Interaction entre VHC et immunité antivirale.....	61
3.1 Les grandes lignes du système immunitaire inné hépatique.....	61
3.1.1 Types cellulaires et immunité innée dans le foie.....	61
3.1.2 Immunité innée dans les lignées hépatocytaires.....	64
3.2 Reconnaissance du VHC par l'hôte.....	65
3.2.1 Le VHC et les TLRs.....	66
3.2.1.1 Le TLR3.....	66
3.2.1.2 Le TLR7.....	66
3.2.2 Le VHC et RIG-I.....	68
3.3 Les virus et la subversion de l'immunité innée .....	69
3.3.1 Quelques exemples de mécanismes d'interférence virale .....	69
3.3.1.1 Au niveau de l'étape de reconnaissance du virus par la cellule-hôte.....	69
3.3.1.2 Au niveau des récepteurs ou de leurs adaptateurs.....	69
3.3.1.3 Au niveau des kinases comme TBK-1 .....	70
3.3.1.4 Au niveau des IRFs.....	71
3.3.1.5 Au niveau de NFκB .....	71
3.3.1.6 Au niveau du type de réponse induite.....	72
3.3.2 Rôle majeur de NS3/4A dans la subversion de l'immunité innée par le VHC .....	72
3.3.2.1 Clivage de TRIF par NS3/4A.....	73
3.3.2.2 Clivage de CARDIF par NS3/4A.....	74
3.3.3 Autres mécanismes de subversion de l'immunité innée par le VHC .....	75
3.4 Étude de la réponse antivirale dans différents modèles d'infection avec le VHC .....	77
3.4.1 Réponse antivirale au VHC dans les lignées hépatocytaires Huh7 .....	78
3.4.1.1 Modèle d'infection.....	78
3.4.1.2 Comparaison de la réponse antivirale au VHC dans les Huh7 et dans les biopsies de foie .....	79
3.4.1.3 Infection avec le VHC et apoptose .....	80
3.4.2 Réponse antivirale dans des hépatocytes primaires humains fœtaux .....	81



3.4.3 Réponse antivirale dans des hépatocytes primaires humains .....	81
3.4.4 Réponse antivirale dans un modèle de souris chimérique SCID-Alb/uPA .....	82
3.4.4.1 Description du modèle .....	82
3.4.4.2 Réponse antivirale.....	82
3.4.4.3 Infection avec le VHC et métabolisme lipidique .....	83
3.4.5 Réponse antivirale chez le chimpanzé infecté avec le VHC .....	86
3.4.5.1 La phase aigüe de l'infection .....	86
3.4.5.2 La clairance virale.....	87
3.4.5.3 La phase chronique .....	87
3.4.6 Réponse antivirale innée chez l'humain.....	88
3.5 HCV, fibrose et cirrhose .....	90
3.6 HCV et traitements .....	92
3.6.1 Généralités.....	92
3.6.2 Nouvelles approches thérapeutiques .....	93
3.6.2.1 Agents antiviraux non spécifiques .....	94
3.6.2.2 Agents antiviraux spécifiques .....	95
3.6.2.2.1 Inhibiteurs de la protéase NS3/4A .....	95
3.6.2.2.2 Inhibiteurs de la polymérase NS5B .....	96
3.6.2.2.3 Inhibiteurs de la traduction protéique .....	97
3.6.2.2.4 Prévention de l'attachement du virus .....	97
3.6.2.2.5 Inhibiteurs de l'assemblage et du relâchement.....	98
3.6.2.3 Agents immunorégulateurs .....	98
OBJET DE LA THÈSE.....	101
CHAPITRE 2: Article 1 .....	103
1. Mise en contexte et présentation.....	104
2. Contributions de la candidate .....	105
Distinct antiviral signaling pathways in primary human hepatocytes and their differential disruption by HCV NS3 protease .....	106
Abstract.....	107
Introduction .....	108
Materials and methods.....	110
Patients, cell culture and dsRNA stimulations .....	110
Quantitative PCR (qPCR) assays .....	110

Microarray data analysis .....	111
HCV NS3/4A-encoded lentivirus preparation and transduction of human hepatocytes .....	111
Immunofluorescence .....	111
Immunoblot analysis .....	112
Results .....	113
Molecular sensors of extracellular and intracellular dsRNA induce an innate antiviral response in human primary hepatocytes .....	113
HCV NS3/4A protease cleaves CARDIF and blocks dsRNA-induced antiviral response in primary cultures of human hepatocytes.....	115
Transcriptomal analysis of NS3/4A-mediated interference of TRIF and CARDIF-dependent pathways.....	116
Discussion.....	118
Acknowledgments .....	120
Figures Legends.....	121
References .....	123
Supplemental Material and Methods .....	131
Microarray data analysis .....	131
PCR assays.....	131
Supplemental Legends.....	133
CHAPITRE 3 .....	140
Effet de la protéase NS3/4A du VHC à l'échelle du transcriptome sur les voies de signalisation antivirales dans des hépatocytes primaires humains.....	140
1. Introduction .....	141
2. Méthodologie.....	142
2.1 Traitement des échantillons et outils d'analyse bioinformatique .....	142
2.2 Définition et sélection des clusters d'intérêt .....	144
2.2.1 poly(I :C) intracellulaire .....	144
2.2.2 ARNdb transcrit <i>in vitro</i> intracellulaire .....	146
2.2.3 poly(I :C) extracellulaire.....	147
3. Résultats .....	150
3.1 Interférence majeure de la réponse immunitaire innée induite par l'ARNdb intracellulaire en présence de la protéase NS3/4A du VHC.....	150
3.1.1 Poly(I :C) intracellulaire .....	150
3.1.2 ARN transcrit <i>in vitro</i> intracellulaire .....	154

3.2 Interférence mineure de la réponse immunitaire innée induite par l'ARNdb extracellulaire en présence de la protéase NS3/4A du VHC.....	157
3.3 Effet majeur de la NS3/4A sur les voies apoptotiques au cours de la réponse immunitaire innée induite par l'ARNdb extracellulaire .....	160
4. Discussion.....	163
CHAPITRE 4: Article 2.....	167
1. Mise en contexte et présentation.....	168
2. Contributions de la candidate .....	169
Characterization of the Antiviral Response in Liver Biopsies and Purified Hepatocytes from Chronically HCV-infected Patients .....	170
Abstract.....	171
Introduction .....	172
Materials and Methods .....	176
Liver Biopsies and Patients Data .....	176
Intrahepatic ISGs mRNA levels quantification.....	176
Intrahepatic HCV RNA quantification.....	177
Immunoblot analysis .....	177
Statistical Methods .....	178
Results .....	179
Major Interferon Stimulated Genes are significantly upregulated in chronically HCV-infected liver biopsies and corresponding isolated primary hepatocytes .....	179
Chemokines CXCL9, CXCL10, CXCL11 and CCL5 are differentially induced in chronically HCV-infected biopsies and corresponding isolated hepatocytes .....	180
Specific antiviral Type I and III Interferons are not induced in chronically HCV-infected liver biopsies and corresponding isolated human hepatocytes .....	181
CARDIF expression is significantly decreased in purified hepatocytes from chronically HCV-infected patients.....	182
ISGs expression levels negatively correlate with HCV RNA in chronically HCV-infected biopsies and corresponding purified hepatocytes.....	183
Discussion.....	185
Acknowledgments .....	188
Figures legends .....	189
References .....	192

CHAPITRE 5 : Discussion .....	204
1. Caractérisation de la réponse antivirale dans des hépatocytes primaires humains .....	205
2. Mécanismes de subversion des voies de l'immunité innée par NS3/4A .....	210
3. Hépatocytes chroniquement infectés et biopsies .....	214
4. L'énigme des infections virales persistantes: quelles attentes vis-à-vis des traitements antiviraux? .....	220
5. Perspectives futures .....	223
CONCLUSION .....	225
BIBLIOGRAPHIE .....	226
ANNEXE 1: Résultats supplémentaires .....	i
Étude de la fonctionnalité des voies de détection de l'ARNdb dans des préparations d'hépatocytes primaires humains chroniquement infectés avec le VHC mis en culture .....	i
ANNEXE 2: Article 1 en co-auteur .....	x
Poly(I :C) and Lipopolysaccharide Innate Sensing Functions of Circulating Human Myeloid Dendritic Cells are affected in Vivo in Hepatitic Virus-infected Patients .....	x
1. Mise en contexte et portée .....	xi
2. Contributions de la candidate .....	xii
3. Article .....	xii
ANNEXE 3: Article 2 en co-auteur .....	xxiii
Primary cultures of human hepatocytes isolated from hepatitis C virus-infected cirrhotic livers as a model to study Hepatitis C infection.....	xxiii
1. Mise en contexte et portée .....	xxiv
2. Contributions de la candidate .....	xxv
3. Article .....	xxv

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **Chapitre 2**

<b>Table 1:</b> Summary of microarray results showing fold increases in gene expression after extracellular and intracellular dsRNA challenges in freshly purified primary human hepatocytes.....	125
<b>Table 2:</b> Major strongly regulated genes in primary human hepatocytes after extracellular dsRNA challenge as obtained by microarrays analysis.....	126
<b>Supplemental table S1:</b> Demographic characteristics of non-infected patients.....	135
<b>Supplemental table S2:</b> Oligonucleotide sequences used for semi-quantitative PCR.....	135
<b>Supplemental table S3:</b> Oligonucleotide sequences used for quantitative PCR.....	136

### **Chapitre 3**

<b>Tableau 1 :</b> Exemples de niveaux d'induction de gènes différenciellement régulés par NS3/4A et rétablis par BILN2061 après stimulation avec de l'ARNdb intracellulaire (poly(I :C)).....	154
<b>Tableau 2:</b> Exemples de niveaux d'induction de gènes interférés par NS3/4A et rétablis par BILN2061 après stimulation avec de l'ARNdb intracellulaire (ARN transcrit <i>in vitro</i> ) .....	157
<b>Tableau 3:</b> Exemples de niveaux d'induction de gènes interférés par NS3/4A et rétablis par BILN2061 après stimulation de la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire.....	162

### **Chapitre 4**

<b>Table 1:</b> Demographic features of chronically HCV-infected patients.....	195
<b>Table 2:</b> Demographic features of non-infected patients .....	196
<b>Supplemental table S1:</b> Oligonucleotide sequences used for quantitative PCR.....	203

### **Annexe 1**

<b>Table S1:</b> Demographic characteristics of chronically HCV-infected patients.....	iii
--	-----

# LISTE DES FIGURES

## Chapitre 1

<b>Figure 1</b> : Formation des complexes ligands/récepteurs et signalisation pour les interférons de type I, II et III.....	4
<b>Figure 2</b> : Activation des facteurs de transcription-clé des voies antivirales : IRF3, IRF7 et NFκB..	8
<b>Figure 3</b> : Les grandes étapes de l'activation de NFκB .....	9
<b>Figure 4</b> : Vue d'ensemble de la structure de l'enhanceosome de l' <i>IFNβ</i> .....	10
<b>Figure 5</b> : Boucle d'amplification positive de la voie des interférons de type I .....	12
<b>Figure 6</b> : Les grandes catégories de récepteurs de pathogènes ou PRRs.....	16
<b>Figure 7</b> : Les TLRs, leurs ligands et leurs adaptateurs .....	18
<b>Figure 8</b> : Voies de signalisation médiées par les TLR7 et 9.....	20
<b>Figure 9</b> : Structure du TLR3.....	21
<b>Figure 10</b> : Modèle de l'interaction entre le TLR3 et son ligand d'ARNdb.....	22
<b>Figure 11</b> : Voie de signalisation de TLR3 .....	25
<b>Figure 12</b> : Domaines et motifs retrouvés chez les récepteurs d'ARN cytosolique de la famille des RLHs .....	27
<b>Figure 13</b> : Spécificité de reconnaissance des virus à ARN par les hélicases de la famille des RLHs .....	28
<b>Figure 14</b> : Mécanisme d'activation de RIG-I .....	30
<b>Figure 15</b> : Reconnaissance des ARNdb courts et des ARNsb à extrémité 5'PPP et activation de RIG-I .....	31
<b>Figure 16</b> : Voie de signalisation médiée par les RLRs.....	34
<b>Figure 17</b> : Bilan des voies de détection des pathogènes viraux et activation de la réponse interféron classique .....	36
<b>Figure 18</b> : Histoire naturelle de l'infection virale avec le VHC .....	41
<b>Figure 19</b> : Organisation du génome et de la polyprotéine du VHC.....	44
<b>Figure 20</b> : Structure et association membranaire des protéines du VHC .....	49
<b>Figure 21</b> : Représentation du cycle viral du VHC.....	53
<b>Figure 22</b> : Représentation des modèles d'étude du VHC.....	57
<b>Figure 23</b> : Le système immunitaire du foie .....	64
<b>Figure 24</b> : Atténuation de la réponse immunitaire innée par le VHC.....	77

<b>Figure 25:</b> Comparaison de l'induction des voies de signalisation médiées par les interférons dans un modèle de souris infectées avec le VHC (A) et chez des patients chroniquement infectés avec le VHC (B).....	845
---	-----

## **Chapitre 2**

<b>Figure 1:</b> Functionality of extracellular and intracellular dsRNA-activated pathways in primary human hepatocytes .....	127
<b>Figure 2:</b> Endogenous CARDIF but not TRIF cleavage after HCV NS3/4A protease expression by lentiviral-transduced primary human hepatocytes .....	128
<b>Figure 3:</b> Impairment of intracellular dsRNA-activated signaling following ectopically expressed NS3/4A HCV protease in primary human hepatocytes.....	129
<b>Figure 4:</b> Top-25 most affected genes following dsRNA stimulation of primary hepatocytes expressing NS3/4A in the absence or presence of BILN2061 .....	130
<b>Figure S1:</b> Characterization of freshly isolated hepatocyte preparations.....	137
<b>Figure S2:</b> Expression of innate immune sensors TLR3, MDA5 and RIGI in normal primary human hepatocytes.....	137
<b>Figure S3:</b> Overall changes in gene expression in primary human hepatocytes after extracellular dsRNA treatment can be grouped in 3 different clusters .....	138
<b>Figure S4:</b> Overall changes in gene expression in human primary hepatocytes after intracellular dsRNA treatment can be grouped in 2 different clusters .....	139

## **Chapitre 3**

<b>Figure 1 :</b> Résultat de la méthode analytique de « clustering » k-means sur l'ensemble du transcriptome d'hépatocytes primaires humains exprimant la protéase virale NS3/4A avec ou sans inhibiteur et stimulés avec de l'ARNdb (poly(I :C)) intracellulaire.....	145
<b>Figure 2 :</b> Résultat de la méthode analytique de « clustering » k-means sur l'ensemble du transcriptome d'hépatocytes primaires humains exprimant la protéase virale NS3/4A avec ou sans inhibiteur et stimulés avec de l'ARNdb (transcrit <i>in vitro</i> ) intracellulaire.....	147
<b>Figure 3 :</b> Résultat de la méthode analytique de « clustering » k-means sur l'ensemble du transcriptome d'hépatocytes primaires humains exprimant la protéase virale NS3/4A avec ou sans inhibiteur et stimulés avec de l'ARNdb extracellulaire.....	149

<b>Figure 4:</b> Variation d'expression génique après stimulation d'hépatocytes primaires humains normaux avec de l'ARNdb intracellulaire en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061.....	152
<b>Figure 5:</b> Variation d'expression génique après stimulation d'hépatocytes primaires humains normaux avec de l'ARNdb intracellulaire (ARN transcrit <i>in vitro</i> ) en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061 .....	156
<b>Figure 6 :</b> Variation d'expression génique après stimulation d'hépatocytes primaires humains normaux avec de l'ARNdb extracellulaire en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061 .....	159
<b>Figure 7 :</b> Variation d'expression génique après stimulation d'hépatocytes primaires humains normaux avec de l'ARNdb extracellulaire en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061 .....	161

## **Chapitre 4**

<b>Figure 1:</b> Analysis of selected ISGs mRNAs expression levels in normal and chronically HCV-infected human liver biopsies and corresponding isolated hepatocytes.....	197
<b>Figure 2:</b> Differential expression of <i>CXCL9</i> , <i>10</i> , <i>11</i> and <i>CCL5</i> genes in normal and chronically HCV-infected liver biopsies and corresponding isolated hepatocytes .....	198
<b>Figure 3:</b> <i>IFN<math>\lambda</math>2</i> weak expression in normal and chronically HCV-infected biopsies and corresponding isolated hepatocytes.....	199
<b>Figure 4:</b> HCV NS3/4A protease expression and concomitant CARDIF decrease in purified hepatocytes from chronically HCV-infected patients .....	200
<b>Figure 5:</b> Correlation of HCV viral load with ISGs mRNA expression in liver biopsies and corresponding hepatocytes from chronically HCV-infected patients .....	201

## **Chapitre 5**

<b>Figure 1:</b> Expression relative des 20 premiers gènes induits suite à la stimulation des voies de détection de l'ARN intracellulaire (A) et extracellulaire (B) en présence de la protéine virale NS3/4A avec ou sans BILN2061 .....	211
<b>Figure 2 :</b> La reconnaissance du VHC par des hépatocytes primaires humains .....	216
<b>Figure 3:</b> La subversion de l'immunité innée par la protéase NS3/4A du VHC dans des hépatocytes primaires humains .....	217



<b>Figure 4 :</b> La réponse immunitaire innée dans des hépatocytes primaires chroniquement infectés avec le VHC .....	218
--	-----

## **Annexe 1**

<b>Figure S1 :</b> Expression de NS3/4A dans des préparations d'hépatocytes primaires provenant de biopsies de foies chroniquement infectés avec le VHC mises en culture .....	iii
<b>Figure S2 :</b> Expression des ARNm codant pour les récepteurs de l'immunité innée TLR3, MDA5 et RIG-I dans des hépatocytes primaires chroniquement infectés avec le VHC et normaux .....	iv
<b>Figure S3 :</b> Fonctionnalité de la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire dans des hépatocytes primaires humains normaux et chroniquement infectés avec le VHC .....	vi
<b>Figure S4 :</b> Fonctionnalité de la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire dans des hépatocytes primaires humains normaux et chroniquement infectés avec le VHC .....	vii
<b>Figure S5:</b> Fonctionnalité des voies de détection de l'ARNdb extracellulaire (edsRNA) et intracellulaire (idsRNA) dans des préparations d'hépatocytes primaires humains normaux et chroniquement infectés avec le VHC .....	ix

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- 5'NTR: région non traduite en 5' (5' non-translated region)
- ADN: acide désoxyribonucléique
- ALT/AST: alanine aminotransférase/aspartate aminotransférase
- ARN: acide ribonucléique
- ARNdb: acide ribonucléique double brin
- ARNm: ARN messenger
- ARNsb: acide ribonucléique simple brin
- ASFV: african swine fever virus
- ATF2: facteur d'activation de la transcription 2 (activator transcription factor 2)
- ATP: adénosine tri-phosphate
- CARD: domaine d'activation et de recrutement des caspases (caspase activation and recruitment domain)
- CARDIF: adaptateur à motif CARD inducteur d'IFN $\beta$  (CARD-adaptor inducing IFN $\beta$ )
- CCL: ligand de récepteur de chémokine
- CCR, CX3CR: récepteur de chémokine
- CD: antigène de différenciation (cluster of differentiation)
- CHC: hépatite C chronique (chronic hepatitis C)
- CMHI: complexe majeur d'histocompatibilité de type I
- CMV: cytomégalovirus
- CPB/P300: cAMP-response element-binding protein (CREB) binding protein/protein 300
- CREB: c-AMP response element binding
- CTD: domaine C-terminal (C-terminal domain)
- C-terminal: carboxy-terminal
- CXCL: ligand des chemokines de type C-X-C (chemokine (C-X-C motif) ligand)
- CypA: cyclophiline A
- DC: cellule dendritique (dendritic cell)
- DDX3: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3
- DEN: virus de la dengue (dengue virus)
- DUBA: enzyme de désubiquitination (deubiquitinating enzyme A)
- edsRNA: ARN double brin extracellulaire (extracellular double strand RNA)
- E3-ligase: ligase à ubiquitine de type E3 (E3 ubiquitin ligase)
- EMCV: virus de l'encéphalomyocardite (encephalomyocarditis virus)

FACS: trieur de cellules à fluorescence (fluorescence-activated cell sorter)  
 FADD: fas-associated death domain  
 FMDV: syndrome pieds-main-bouche (foot and mouth disease virus)  
 FRET: transfert d'énergie fluorescente par résonance (fluorescence resonance energy transfer)  
 GAS: site d'activation par l'interféron  $\gamma$  (gamma interferon activating site)  
 GFP: protéine fluorescente verte (green fluorescence protein)  
 HCV: virus de l'hépatite C (hepatitis C virus)  
 HBV: virus de l'hépatite B (hepatitis B virus)  
 HMG-I (Y): high mobility group-1 (Y)  
 HSV 1, 2: virus de l'herpes 1, 2 (herpes simplex virus 1, 2)  
 idsRNA: ARN double brin intracellulaire (intracellular double strand RNA)  
 IFIT1-3: interféron-induced protein with tetratricopeptide repeats 1-3  
 IFN: interféron (interferon)  
 IFNAR1/2: récepteur de l'interféron  $\alpha$  de type 1/2 (IFN $\alpha$ -receptor 1/2)  
 IFNGR1/2: récepteur de l'interféron  $\gamma$  de type 1/2 (IFN $\gamma$ -receptor 1/2)  
 IFNRL1: récepteur de l'interféron  $\lambda$  de type 1 (IFN $\lambda$ -receptor 1)  
 IKK $\epsilon$ : I $\kappa$ B (inhibitor of  $\kappa$ B) kinase  $\epsilon$   
 IL: interleukine (interleukin)  
 IL10R2: récepteur à l'interleukine 10 de type 2 (IL10 receptor 2)  
 IPS-1: IFN $\beta$  promoter stimulator-1  
 IRAK: IL-1 receptor-associated kinase  
 IRES: site d'entrée interne du ribosome (internal ribosome entry site)  
 IRF1-9: facteurs de régulation de l'interféron 1 à 9 (interferon regulatory factor 1-9)  
 ISG: gène stimulé par l'interféron (interferon stimulated gene)  
 ISGF3: IFN-stimulated gene factor 3  
 ISRE: élément de réponse à la stimulation par l'interféron (interferon stimulated response element)  
 JAK1: kinase Janus (janus kinase 1)  
 kb: kilobase  
 kDa: kilodalton  
 LCMV: virus de la chorioméningite lymphocytaire (lymphocytic choriomeningitis virus)  
 LDL: lipoprotéine de faible densité (low density lipoprotein)  
 LGP2: laboratory of genetics and physiology 2  
 LPS: lipopolysaccharide  
 LRR: répétition riches en leucine (leucin-rich repeats)

MAL: MyD88-adaptor-like  
MAPK: mitogen-activated protein kinase  
MAVS: mitochondrial anti-viral signaling  
MCMV: cytomegalovirus murin (murine cytomegalovirus)  
MDA5: melanoma differentiation-associated gene-5  
MEF: fibroblastes d'embryon de souris (mouse embryonic fibroblasts)  
MEKK-1: MAP kinase kinase-1  
MITA: médiateur mitochondrial de l'activation d'IRF3 (mitochondrial mediator of IRF-3 activation)  
MOI: multiplicity of infection (multiplicité d'infection)  
Mx: protéine de résistance au myxovirus (myxovirus resistance protein)  
MyD88: myeloid differentiation primary response gene 88  
NAK: synonyme de TBK-1  
NAP1: NAK-associated protein 1  
NDV: newcastle disease virus  
NEMO: modulateur essentiel du facteur de transcription NFκB (NFκB-essential modulator)  
NFκB: facteur nucléique-kappa B (nucleic factor kappa-B)  
NK/NKC: natural killer cell  
NLR: nucleotide-binding domain and leucine-rich repeats  
NLRX-1: nod-like receptor X1  
NO: nitric oxyde  
NOD: nucleotide-binding oligomerization domain  
OAS: oligoadenylate synthetase  
PAMP: motif moléculaire associé à un pathogène (pathogen-associated molecular pattern)  
pb: paire de bases  
PBMC: cellules mononucléaires du sang périphérique (peripheral blood mononuclear cells)  
PCR: polymerase chain reaction  
PI3K: phosphoinositide 3 kinase  
PIAS: inhibiteur du facteur STAT activé (protein inhibitor of activated STAT)  
PIASy: protein inhibitor of activated signal transducers and activators of transcription  
PKR: protéine kinase dépendante de l'ARN double-brin (dsRNA-dependent protein kinase)  
poly(I:C): acide polyinosinique-polycytidylique (polyinosinic:polycytidylic acid)  
PP2A: protein phosphatase 2A  
PRD: domaine de régulation positif (positive regulatory domain)

PRR: récepteur de reconnaissance des pathogènes (pathogen recognition receptor)  
RHIM: RIP-homotypic interaction motif  
RIG-I: protéine inductible à l'acide rétinoïque 1 (retinoic-acid inducible gene-1)  
RIP1: receptor-interacting protein 1  
RLH: hélicase de type RIG-I (RIG-I-like helicase)  
RLR: récepteur de type RIG-I (RIG-I-like receptor)  
RSV: virus du sarcome de Rous (Rous sarcoma virus)  
RSV: virus syncytial respiratoire (respiratory syncytial virus)  
RT: transcriptase inverse (reverse transcriptase)  
SARM: sterile  $\alpha$ - and armadillo-motif-containing protein  
SCID: severe combined immunodeficiency  
SH2: Src (sarcoma) homology 2  
shRNA: petits ARN en épingle à cheveux (small hairpin RNA)  
SIKE: suppressor of IKK $\epsilon$   
siRNA: petits ARN interférant (small interfering RNA)  
SOCS: suppresseur de signalisation des cytokines (suppressor of cytokine signalling)  
SR-B1: scavenger receptor B1  
STAT: transducteur de signal et activateur de transcription (signal transducer and activator of transcription)  
STING: stimulator of interferon genes  
SUMO: facteur de modification de type ubiquitine (small ubiquitin-like modifier)  
TAB2: transforming growth factor  $\beta$ -activating kinase (TAK) binding protein 2  
TAK: transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase  
TAK1: TGF- $\beta$  activated kinase 1  
TBK-1: TANK-binding kinase 1  
TFIID: facteur de transcription IID (transcription factor IID)  
TIR: toll/interleukin 1 receptor  
TIRAP: TIR domain-containing adaptor protein  
TLR: récepteur de type toll (toll-like receptor)  
TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$   
TRADD: TNF receptor-associated death domain  
TRAF: tumor necrosis factor receptor-associated factor  
TRAM: TRIF-related adaptor molecule  
TRIF: TIR domain-containing adaptor-inducing IFN $\beta$

TYK2: kinase à tyrosine (tyrosine kinase 2)

UTR: région non traduite (untranslated region)

VACV: virus vaccinia (vaccinia virus)

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

VHC: virus de l'hépatite C (hepatitis C virus)

VHS: virus de l'herpes simplex

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

VISA: virus-induced signaling adapter

WNV: virus du Nil occidental (west Nile virus)

## LISTE DES PUBLICATIONS

**Jouan L.**, Chatel-Chaix L., Melançon P., Rodrigue-Gervais I.G., Raymond V., Selliah S., Bilodeau M., Grandvaux N. and Lamarre D.

*Characterization of the Antiviral Response in Liver Biopsies and Purified Hepatocytes from Chronically HCV-infected Patients.*

**En préparation.** (Inclus dans la thèse, Chapitre 4).

**Jouan L.**, Melançon P., Rodrigue-Gervais I.G., Raymond V., Selliah S., Boucher G., Bilodeau M., Grandvaux N. and Lamarre D.

*Double-stranded RNA-activated Antiviral Responses in Human Primary Hepatocytes and Interfering Activities by HCV NS3/4A Protease.*

**J Hepatol.** 2010 Feb;**52(2):167-75.** (Inclus dans la thèse, Chapitre 2).

Rodrigue-Gervais I.G.<sup>1</sup>, **Jouan L.**<sup>1</sup>, Rigsby H., Willems B. and Lamarre D.

*Higher Efficacy of Pegylated-IFN $\alpha_2$ /ribavirin Combined Therapy in HCV Patients with Functional Myeloid Dendritic Cells.*(<sup>1</sup>: contribution égale).

**En préparation.** (Non-inclus dans la thèse).

Rodrigue-Gervais I.G., **Jouan L.**, Beaulé G., Sauve D., Bruneau J., Willems B., Sekaly R.P. and Lamarre D.

*Poly(I:C) and Lipopolysaccharide Innate Sensing Functions of Circulating Human Myeloid Dendritic Cells Are Affected in Vivo in Hepatitis C Virus-Infected Patients.*

**J Virol.** 2007 Jun;**81(11):5537-46.** (Inclus dans la thèse, Annexe 2).

Rodrigue-Gervais I.G., Rigsby H., **Jouan L.**, Sauve D., Sekaly R.P., Willems B. and Lamarre D.

*Dendritic Cell Inhibition Is Connected to Exhaustion of CD8<sup>+</sup> T Cell Polyfunctionality During Chronic HCV Infection.*

**J Immunol.** 2010 Mar 15;**184(6):3134-44.** (Non-inclus dans la thèse).

Raymond V.A., Selliah S., Ethier C., Houle R., **Jouan L.**, Maniere T., Lamarre D., Willems B. and Bilodeau M.

*Primary Cultures of Human Hepatocytes Isolated From Hepatitis C Virus-Infected Cirrhotic Livers as A Model to Study Hepatitis C Infection.*

**Liver Int. 2009 Jul;29(6):942-9.** (Inclus dans la thèse, Annexe 3).

Soucy-Faulkner A., Mukawera E., Fink K., Martel A., **Jouan L.**, Nzengue Y., Lamarre D., Vande Velde C. and Grandvaux N.

*Requirement of NOX2 and Reactive Oxygen Species for Efficient RIG-I-Mediated Antiviral Response Through Regulation of MAVS Expression.*

**Plos Pathogen. 2010 Jun 3; 6 (6) : e1000930.** (Non-inclus dans la thèse).

**Jouan L.** and Szatmari G.

*Interactions of the Caulobacter Crescentus XerC and XerD Recombinases with the E. coli Dif Site.*

**FEMS Microbiol Lett. 2003 May 28;222(2):257-62.** (Non-inclus dans la thèse).



*À mon père.*

*La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi !»*

Albert Einstein.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier Dr Daniel Lamarre qui m'a soutenue tout au long de ce doctorat, qui m'a fait confiance et sans lequel je n'en serais probablement pas là aujourd'hui. Malgré les difficultés et les impasses, tu m'as toujours encouragée à continuer.

Dr Nathalie Grandvaux m'a aidée, soutenue, encouragée, guidée, conseillée et tellement plus encore tout au long de ces années. À maintes reprises tu m'as rassurée et sans ton support, rien de tout ce travail n'aurait été possible. Ton implication scientifique dans les projets et ton amitié m'ont définitivement encouragée à aller jusqu'au bout de ce projet. Je porte une grande admiration pour ton travail, ta passion pour la science et ton humilité.

J'adresse un remerciement particulier au Dr Marc Bilodeau et toute son équipe de recherche. Valérie-Ann et Suba, merci pour votre amitié, votre support et vos hépatocytes! Sans vous, ce projet n'aurait certainement pas eu lieu. Valerie-Ann et Ben, un merci particulier pour m'avoir soutenue jusqu'à la fin, les décors de la Saint-Valentin dans mes pots de plantes et les rouleaux de chez la Pagode. Suba depuis notre bac, on faisait déjà équipe dans les laboratoires puis nous nous sommes retrouvées voisines de labo. Merci pour ta douceur, ton soutien et ta sincérité.

Un remerciement immense à Pierre, avec qui j'ai cheminé depuis l'installation de la première chaise du labo. Tout au long de mon doctorat, tu as toujours été là pour tous les conseils, les manips, les calculs incompréhensibles, les chicanes de vieux couples, en tout cas, c'est ce que les autres disaient!

Ian, notre « Jesus lite », tu m'as vraiment éclairée, pour vrai, ton analyse fine de mon projet m'a toujours impressionnée, tes conseils judicieux, ton soutien tout au long de ces années et ton amitié. Un merci à ta blonde Karin, pour sa douceur et son écoute, et les poignées de bonbons sur les bureaux...

Hawley, je te remercie pour ton soutien et ta bonne humeur communicative, et les cupcakes bleus!!!

Laurent, un grand merci pour tes conseils scientifiques, ton soutien, tes encouragements, ton aide jusqu'à la fin, tu m'as donné un sacré coup de main. Un merci aussi pour tes connaissances

musicales et culinaires et tes récits de week-ends... Toi, Ian et Pierre, vous m'avez vraiment soutenue dans les moments les plus sombres.

Un merci immense aux « iriciens », en particulier à Martin, tu m'as beaucoup aidée ces derniers temps depuis ma « grande migration » vers l'IRIC, merci pour tes conseils éclairés, ton support et ton bureau! Merci également à Marie-Ève, Salwa, Fernando et Marie-Anne qui m'ont accompagnée en cette fin de parcours.

Je voudrais particulièrement remercier les membres de mon jury de thèse pour vos conseils éclairés ainsi que toutes vos observations qui ont grandement contribué à améliorer ce travail.

Je voudrais également adresser mes remerciements les plus sincères au Dr Daniel Lajeunesse, directeur du Département de Sciences Biomédicales, pour ses encouragements et son support; merci également à Madame France Fauteux qui a géré mon dossier académique et qui a toujours été disponible pour répondre à mes multiples questions. Merci au Département de Sciences Biomédicales, au CRCHUM et à la Fondation Canadienne du Foie, qui m'ont considérablement aidée financièrement par l'octroi de bourses.

Un merci immense à Patricia, Josée, Véro et Gigi, mes « best » qui m'ont toujours soutenue, écoutée, accompagnée en véritables amies que vous êtes.

Un merci à ma mère, pour qui j'ai une admiration immense pour ce qu'elle est et ce qu'elle fait, merci de m'avoir encouragée, écoutée, secouée et réconfortée, merci pour tout.

À mon amour, je n'ai même pas les mots pour te dire à quel point je te remercie de m'avoir comprise avec une patience, une sérénité et un calme à toute épreuve. Sans toi, je ne serais certainement pas rendue là. Merci pour ton amour et merci d'être là.

Finalement, à mon père qui n'a pas pu suivre la fin de mon doctorat. Le 2 décembre 2009, tu es parti, mais j'espère que tu sais à quel point tu m'as aidée dans mon cheminement toutes ces années. Tu seras toujours dans mon cœur.

## **CHAPITRE 1: Introduction**

# 1 Immunité innée antivirale

## 1.1 Présentation

Le système de l'immunité innée constitue la première ligne de défense non spécifique de l'hôte contre son invasion par des agents pathogènes et joue un rôle crucial à la fois dans la reconnaissance de ceux-ci ainsi que dans l'élaboration d'une réponse pro-inflammatoire précoce (Medzhitov et Janeway, 2000; Mogensen, 2009). Plus tardivement dans l'infection, la réponse immunitaire acquise sera responsable de l'élimination du pathogène de façon spécifique, ainsi que de la génération d'une mémoire immunitaire (Mogensen, 2009). La capacité du système immunitaire inné à reconnaître et à limiter l'infection repose sur de nombreux mécanismes comme: l'activation du complément, la reconnaissance de pathogènes par des récepteurs spécifiques appelés PRRs (Pathogen Recognition Receptors), la phagocytose ou encore l'autophagie.

La plupart des cellules participant à l'immunité innée peuvent détecter une infection grâce à leurs PRRs comme les récepteurs de type Toll dits TLRs (Toll Like Receptors) ou les récepteurs de type RIG-I appelés RLRs (RIG-I-Like Receptors), qui sont des récepteurs aptes à reconnaître des motifs spécifiques aux pathogènes. Ces motifs, qui ont l'avantage d'être hautement conservés à l'intérieur d'une même classe de microorganismes tout en étant essentiels à leur survie et différenciables du Soi, sont appelés : les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ainsi, immédiatement ou quelques heures suivant la détection d'un pathogène viral, le système de l'immunité innée engendre l'activation de cascades de signalisation aboutissant à l'activation de facteurs de transcription-clé, à l'origine de la synthèse des interférons de type I et d'une grande variété de cytokines pro-inflammatoires et de chemokines (Takaoka et Yanai, 2006). L'induction de la synthèse des interférons de type I joue un rôle fondamental dans l'élimination des virus, permettant l'expression de nombreux gènes inductibles à l'interféron appelés ISGs (Interferon Stimulated Genes) et dont les fonctions influencent des événements cellulaires-clé comme la synthèse protéique, l'arrêt de la croissance cellulaire ou encore l'apoptose, tout autant de mécanismes destinés à créer un état antiviral au sein même de la cellule infectée (fonction autocrine) ainsi que dans les cellules environnantes (fonction paracrine).

Les interférons (IFNs) de type I, effecteurs antiviraux puissants, ont également une répercussion sur la maturation des cellules dendritiques, l'activation des cellules NK, la production d'anticorps ainsi que sur la différenciation des cellules T CD8<sup>+</sup> en augmentant leur potentiel cytotoxique et en stimulant leur production d'IFN de type II (IFN $\gamma$ ) (Chung et al., 2008). Il existe

donc une interaction bien coordonnée entre la détection du pathogène par les PRRs, l'activation de leurs voies de signalisation et la synthèse de cytokines correspondant à l'activation de l'immunité innée, et les réponses plus spécialisées qui sont développées au cours de la réponse immunitaire acquise et qui font intervenir des cellules effectrices hautement spécialisées. Ceci permet donc de faire un continuum entre ces deux types de réponses; la première apparaissant très rapidement et visant à contrôler l'infection alors que la seconde, plus lente, est hautement spécifique pour un pathogène donné (Honda et al., 2006; Kawai et Akira, 2008; Theofilopoulos et al., 2005).

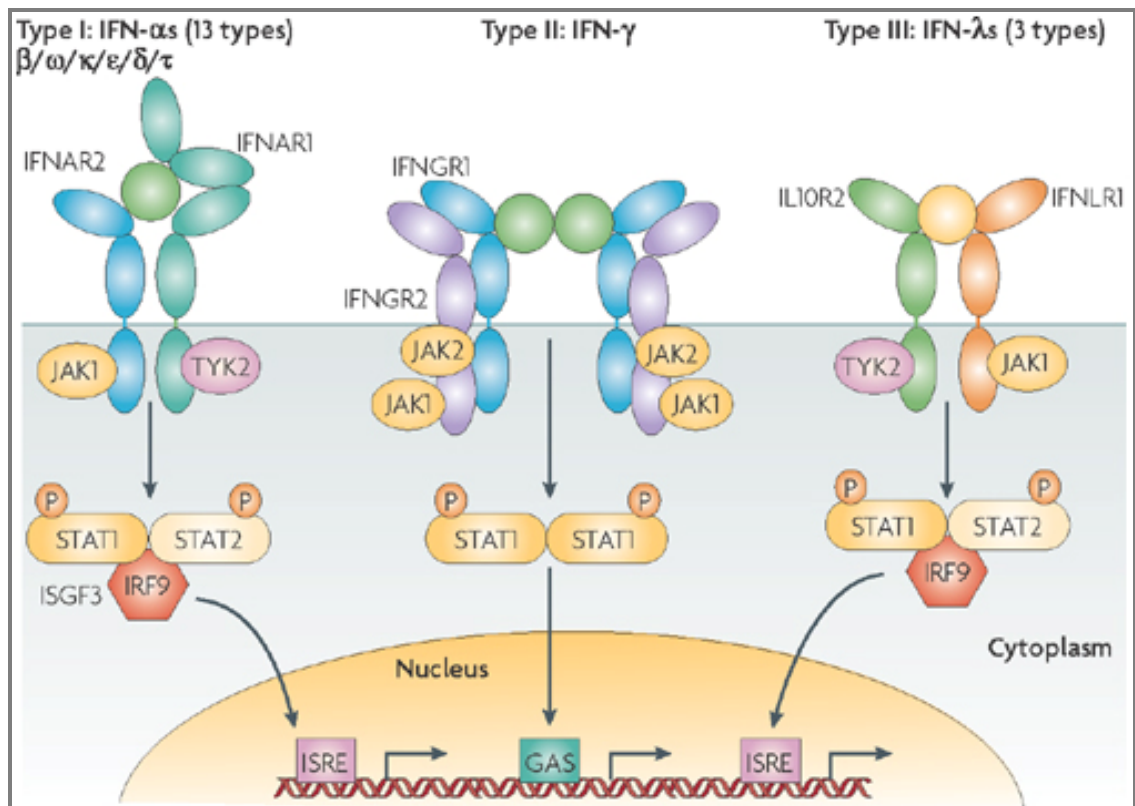
## 1.2 La réponse antivirale

### 1.2.1 Les interférons : des effecteurs puissants de la réponse antivirale

Les IFNs sont un groupe de cytokines inductibles qui ont un rôle central au cours des réponses immunitaires antivirales innées, parce qu'ils établissent à la fois un état intracellulaire antiviral, prévenant ainsi la réplication virale, mais aussi parce qu'ils restreignent la propagation du virus aux cellules avoisinantes (Randall et Goodbourn, 2008; Stetson et Medzhitov, 2006). Les IFNs ont été ainsi nommés pour leur capacité d'interférer avec la réplication virale dans une cellule et sont divisés en trois grands types : I, II et III (Vilcek, 2006). Les IFNs de type I sont composés de gènes variés dont les *IFN $\alpha$*  et *IFN $\beta$*  (Taniguchi et al., 1980) et d'autres comme les *IFN $\epsilon$*  ou *IFN $\omega$*  (Pestka et al., 2004). Chez l'homme tout comme chez la souris, les gènes codant pour les *IFN $\alpha$*  sont composés de plus de 13 sous-familles de gènes (14 chez la souris), alors qu'un seul gène a été trouvé codant pour l'*IFN $\beta$*  (Weissmann et Weber, 1986). Tous ces gènes sont regroupés au niveau d'un même locus sur le même chromosome (K9 pour l'humain et K4 pour la souris). L'IFN de type II fait référence à l'*IFN $\gamma$* , un gène existant en une seule copie et qui est structurellement différent des IFNs de type I. L'*IFN $\gamma$*  est typiquement induit dans les cellules du système immunitaire, comme les cellules T ou encore les cellules NKC (Natural Killer Cells) (Farrar et Schreiber, 1993). Plus récemment, de nouveaux membres de la famille des IFNs ont été découverts: les interférons *IFN $\lambda$ 1*,  *$\lambda$ 2* et  *$\lambda$ 3*, aussi nommés *IL29*, *IL28A* et *IL28B*, et classés dans la famille des IFNs de type III (Ank et al., 2006; Farrar et Schreiber, 1993; Pestka et al., 2004; Uze et Monneron, 2007). Ces derniers sont induits dans des cellules infectées par un virus et leur transcription nécessite des mécanismes similaires à ceux requis pour la transcription des *IFN $\alpha$*  et  *$\beta$* .

L'attachement des trois classes d'IFNs à leur récepteur cellulaire induit des événements similaires mais pas identiques (**Fig. 1**). Ces événements incluent la phosphorylation de JAK1 et de TYK2, ainsi que l'activation des protéines STAT1 à 5 (Dumoutier et al., 2004; Kotenko et al.,

2003; Kotenko et Langer, 2004; Pestka et al., 2004). Les STATs activés pourront par la suite induire la transcription de groupes de gènes spécifiques, comme les ISGs ou encore ceux codant pour d'importants médiateurs de la réponse antivirale (Doyle et al., 2006; Marcello et al., 2006; Sadler et al., 2009). Parmi les ISGs les plus connus, on retrouve PKR qui est un récepteur à ARNdb, OAS, ainsi que les protéines Mx (Stark et al., 1998).



**Figure 1 :** Formation des complexes ligands/récepteurs et signalisation pour les interférons de type I, II et III

Les IFNs de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) interagissent avec les récepteurs IFNAR1 et IFNAR2. L'IFN de type II (IFN  $\gamma$ ) interagit avec les IFNGR1 et IFNGR2. Finalement, le groupe des IFNs de type III (IL28A, B et IL29) interagit avec IL10R2 et IFNLR1. Ces récepteurs sont associés avec deux kinases de la famille des JAK : JAK1 et TYK2 pour les IFNs de type I et III, JAK1 et JAK2 pour l'IFN de type II. Notons que tous les récepteurs aux IFNs appartiennent à la famille des récepteurs de cytokine à hélice de classe 2 constitués de 200 aa structurés en 2 sous-domaines de 100 aa. Ces derniers contiennent habituellement le site de liaison au ligand. L'IFNAR1 est atypique dans la mesure où son domaine extracellulaire est dupliqué. Le récepteur à l'IFN $\gamma$  est un homodimère antiparallèle présentant un axe de symétrie double. L'IFN $\gamma$  s'attache aux deux chaînes du récepteur IFNGR1 stabilisées par les deux chaînes de l'IFNGR2. Figure tirée de (Borden et al., 2007).

### 1.2.1.1 Les interférons de type I

Les interférons de type I stimulent la mise en place de mécanismes de défense contre différents virus et sont mis en jeu très tôt après l'infection (Isaacs et Lindenmann, 1957). La plupart



des cellules somatiques produisent ces IFNs et y répondent, mais certaines cellules sont particulièrement spécialisées dans la production de quantités importantes d'IFN  $\alpha$  et  $\beta$ , comme les DCs plasmacytoïdes. Ces IFNs activent une voie de signalisation commune menant à la transcription d'une centaine de gènes, les ISGs, et ce grâce à l'activation du complexe ISGF3, réunissant les facteurs STAT1, STAT 2 et IRF9 (van Boxel-Dezaire et al., 2006).

### **1.2.1.2 L'interféron de type II**

Le seul membre de cette famille est l'IFN $\gamma$ , qui est sécrété par des cellules immunitaires activées, principalement les cellules T et les cellules NK. L'IFN $\gamma$  exerce sa fonction biologique par attachement à son récepteur dimérique appelé IFNGR.

### **1.2.1.3 Les interférons de type III**

En 2003, deux publications ont décrit les IFN $\lambda$ 1 et  $\lambda$ 2 ou IL29 et IL28 (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Ces IFNs sont structurellement et génétiquement distincts des autres types d'IFNs et reconnaissent un récepteur qui leur est spécifique. Cela dit, les IFNs de type I et III induisent des groupes de gènes similaires par des voies de signalisation identiques et aboutissent à la synthèse d'importants médiateurs de la réponse antivirale (Doyle et al., 2006; Marcello et al., 2006).

## **1.2.2 IRFs et NF $\kappa$ B : facteurs de transcription-clé des interférons**

### **1.2.2.1 Les IRFs**

La famille des facteurs de transcription des IRFs (Interferon Regulatory Factors) regroupe neuf membres, d'IRF1 à IRF9 (Mamane et al., 1999). Tous les IRFs sont caractérisés par une région bien conservée d'attachement à l'ADN en région N-terminale d'environ 120 aa, apte à reconnaître des séquences d'ADN similaires appelées les ISRE (IRF-binding element/IFN-stimulated response element), avec la séquence consensus suivante : 5'-AANNGAAA-3' (Fujii et al., 1999). Parmi les IRFs, 4 d'entre eux, les IRF1, 3, 5 et 7 ont été identifiés comme des régulateurs positifs de la transcription des IFNs de type I. L'IRF1 a d'ailleurs été le premier IRF associé à l'activation des promoteurs des IFNs de type I (Miyamoto et al., 1988). Cependant, des essais ultérieurs dans des cellules IRF1<sup>-/-</sup> et IRF5<sup>-/-</sup> ont révélé que ni l'un ni l'autre de ces facteurs n'étaient essentiels pour l'induction des IFNs de type I (Matsuyama et al., 1993). L'IRF5 aurait plutôt un rôle de régulation

de l'expression des gènes codant pour des cytokines inflammatoires, comme l'IL12 et le TNF $\alpha$  (Takaoka et al., 2005).

Les IRF3 et IRF7 ont fait l'objet de nombreuses études étant donné que ceux-ci sont des régulateurs-clé de l'induction de la transcription des IFNs de type I au cours d'une infection virale (Honda et al., 2005; Sato et al., 2000; Wathélet et al., 1998). Le facteur IRF3 est exprimé de façon constitutive et réside dans le cytosol sous forme latente, jusqu'à son activation au cours de laquelle il sera phosphorylé, ce qui engendre sa dimérisation puis sa translocation au noyau (Lin et al., 1998; Sato et al., 1998; Yoneyama et al., 1998). L'IRF3 contient en effet plusieurs sites potentiels de phosphorylation au niveau de sa région C-terminale, comme les sérines 385, 386 dits les « 2 S sites », ainsi que les sérines 396, 398, 402 et 405 et la thréonine 404 (« 5 ST sites »).

De façon identique à l'IRF3, l'IRF7 est cytosolique et phosphorylé au niveau d'une sérine en région C-terminale permettant sa dimérisation puis sa translocation au noyau. L'IRF7 peut former des homodimères ou des hétérodimères avec l'IRF3, ces dimères ayant des effets différents sur l'induction des membres de la famille des IFNs de type I (Lin et al., 2000; Marie et al., 1998). En effet, l'IRF3 est un puissant activateur de la transcription du gène codant pour l'IFN $\beta$ , mais pas pour les IFN $\alpha$  excepté l'IFN $\alpha$ 4, alors que l'IRF7 active efficacement à la fois les IFN $\alpha$  et  $\beta$  (Marie et al., 1998; Sato et al., 2000; Sato et al., 1998). Notons que la demi-vie de l'IRF7 est courte (0.5 à 1hr) (Sato et al., 2000), dû à sa susceptibilité à une dégradation dépendante de l'ubiquitination (Yu et al., 2005). L'IRF7 induit ainsi de façon transitoire les IFNs de type I, de façon à contrôler une surexpression d'IFN qui pourrait être toxique pour l'organisme (Yu et al., 2005). Finalement, l'IRF7 agit plus tardivement dans l'infection virale, la première phase étant plutôt sous le contrôle de l'IRF3 (Sato et al., 2000).

Les deux voies de signalisation passant par les TLRs et les RLRs, comme nous le verrons en détail plus bas, culminent pour aboutir à l'activation de ces facteurs de transcription. Quel que soit le mécanisme menant à son activation, l'IRF3 sous sa forme dimérique (soit homodimérique ou hétérodimérique avec l'IRF7), migre jusqu'au noyau et forme un complexe avec les co-activateurs CBP et/ou p300. Suite à la reconnaissance de sa séquence-cible au niveau des promoteurs des IFNs de type I, de cytokines et de chemokines, ce complexe permettra de modifier la structure de la chromatine et d'engendrer ainsi le mécanisme de la transcription (Lin et al., 1998; Sato et al., 1998; Yoneyama et al., 1998).

La protéine TBK-1, originellement identifiée dans le contexte de la régulation de l'activité de NF $\kappa$ B, s'est avérée être la kinase à sérine-thréonine essentielle pour la phosphorylation des IRF3

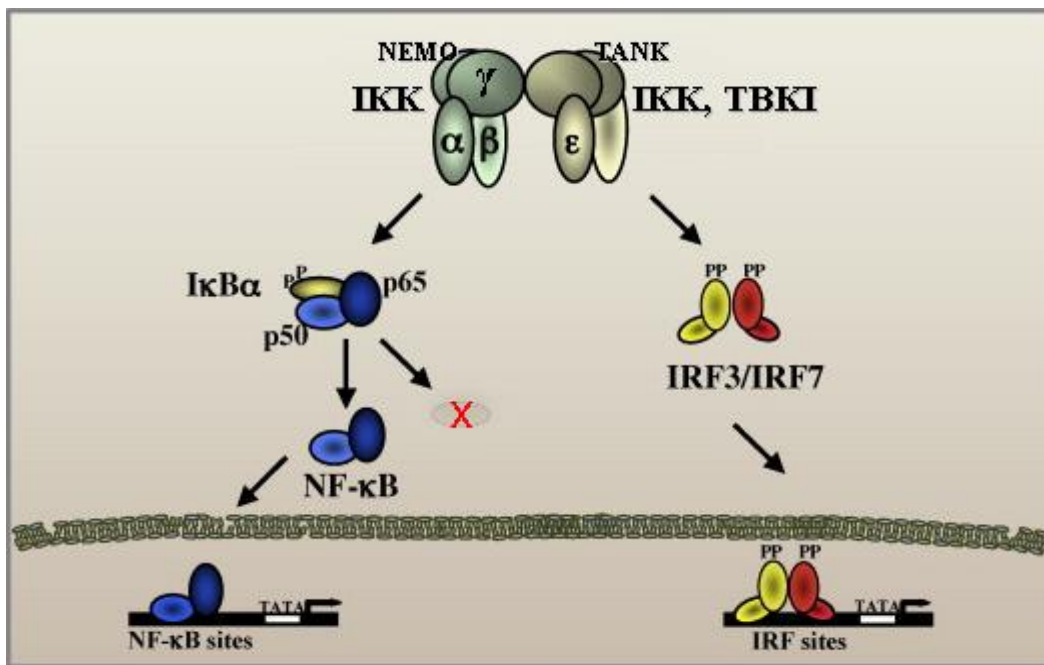
et 7 (Fitzgerald et al., 2003; Hemmi et al., 2004; Sharma et al., 2003). TBK-1 et IKK $\epsilon$  régulent l'activation de NF $\kappa$ B au niveau de la phosphorylation en région C-terminale du domaine de transactivation de RelA et de c-Rel, ce qui module leur localisation cellulaire et leur potentiel de transactivation (Harris et al., 2006; Mattioli et al., 2006). De plus, TBK-1 et IKK $\epsilon$  phosphorylent directement IRF3 et IRF7 au niveau de résidus-clé de leur région C-terminale *in vitro* (**Fig. 2**) (McWhirter et al., 2004; Tenover et al., 2004). En fait, des analyses sur des souris TBK-1<sup>-/-</sup> et IKK $\epsilon$ <sup>-/-</sup> ont permis de démontrer que TBK-1 était principalement impliquée dans la phosphorylation des IRF3 et 7 lors d'une réponse antivirale (Hemmi et al., 2004; Perry et al., 2004). Cela dit, IKK $\epsilon$  structurellement apparentée à TBK-1, a aussi été identifiée comme une kinase phosphorylant IRF3 et IRF7 *in vitro*; par contre des souris déficientes pour cette kinase produiront les mêmes niveaux d'IFN $\beta$ , ce qui démontre une contribution plus minime pour cette kinase. TBK-1 est exprimée de façon constitutive et ubiquitaire contrairement à IKK $\epsilon$  plutôt exprimée dans les cellules immunitaires (Peters et Maniatis, 2001; Shimada et al., 1999) mais inductible dans les cellules non-hématopoïétiques suite à une infection virale par exemple (Aupperle et al., 2001; Hemmi et al., 2004).

Tenover et al ont démontré également le rôle important d'IKK $\epsilon$  dans la régulation de certains gènes antiviraux spécifiques. IKK $\epsilon$  pourrait en fait intervenir lors de l'activation de la voie classique des IFNs au niveau de certains promoteurs dits IKK $\epsilon$ -dépendants qui requièrent la présence de cette kinase agissant possiblement via une phosphorylation au niveau de STAT1 nécessaire à la machinerie de transcription (Tenover et al., 2007).

### 1.2.2.2 NF $\kappa$ B

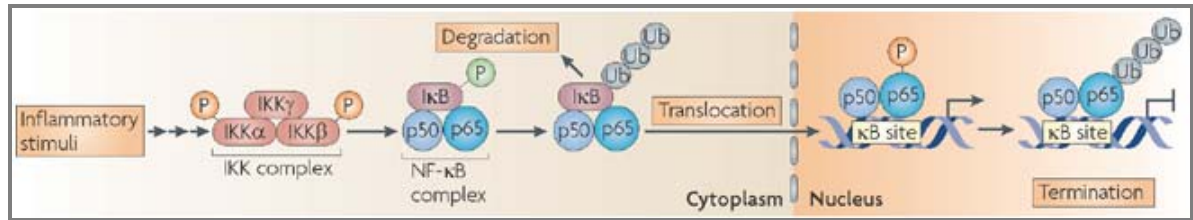
La famille de NF $\kappa$ B est constituée de 5 membres, RelA (p65), RelB, C-Rel, p105 (NF $\kappa$ B1, précurseur de p50) et p100 (NF $\kappa$ B2, précurseur de p52) chez les mammifères. NF $\kappa$ B forme un homodimère ou un hétérodimère et contrôle l'expression de gènes impliqués dans l'immunité innée et adaptative, l'inflammation, l'apoptose, la prolifération cellulaire, les réponses au stress ainsi que la progression des cancers (Gilmore, 2006; Karin et Greten, 2005). La forme activée de NF $\kappa$ B la plus souvent retrouvée suite à l'activation des voies TLRs ou RLRs est un hétérodimère constitué de RelA et de p50. Les dimères de ces protéines s'attachent aux sites  $\kappa$ B localisés au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles (Hoffmann et al., 2006). Dans les cellules non stimulées, l'hétérodimère est sous forme latente cytoplasmique et inactive dû à son interaction avec les protéines I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\epsilon$ ) qui masquent le signal de localisation nucléaire. La stimulation avec des ligands des TLRs ou RLRs catalyse rapidement la phosphorylation des protéines I $\kappa$ B. En

effet, il y a formation d'un complexe multiprotéique, appelé le complexe IKK constitué de 2 composants catalytiques,  $IKK\alpha$  et  $IKK\beta$ , ainsi qu'un composant régulateur,  $IKK\gamma$  ou NEMO. Une fois phosphorylées par le complexe IKK, les protéines  $I\kappa B$  sont dégradées par le protéasome 26S, permettant ainsi la translocation de NF $\kappa$ B au noyau (**Fig. 3**). Cette voie d'activation dite canonique est responsable de l'induction des cytokines inflammatoires comme le TNF $\alpha$  et l'IL6 suite à une activation des TLRs (Hayden et al., 2006). Pour ce qui est de la terminaison de la transcription NF $\kappa$ B-dépendante, plusieurs mécanismes sont utilisés, citons entre autres la diminution de la stabilité de p65 par la protéine SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signalling-1) (Ryo et al., 2003). La famille des PIAS, en particulier les protéines PIAS1 et PIASy, des SUMO E3 ligases, (Small Ubiquitin-Like Modifier) peuvent inhiber pour leur part les protéines STAT et bloquer ainsi l'activation de la transcription médiée par NF $\kappa$ B (Liu et al., 2004; Liu et al., 2005).



**Figure 2 :** Activation des facteurs de transcription-clé des voies antivirales : IRF3, IRF7 et NF $\kappa$ B

L'activation des voies de signalisation aboutit au recrutement des complexes  $IKK\alpha,\beta$  et  $\gamma$  (NEMO), qui permet la phosphorylation de  $I\kappa B\alpha$  et sa dégradation, permettant de libérer NF $\kappa$ B qui pourra alors transloquer au noyau. En parallèle, l'activation d' $IKK\epsilon$  et de TBK-1 permet la phosphorylation d'IRF3 et IRF7 aptes à transloquer au noyau et à activer la transcription de leurs gènes cibles. Figure adaptée de (Hiscott, 2007).



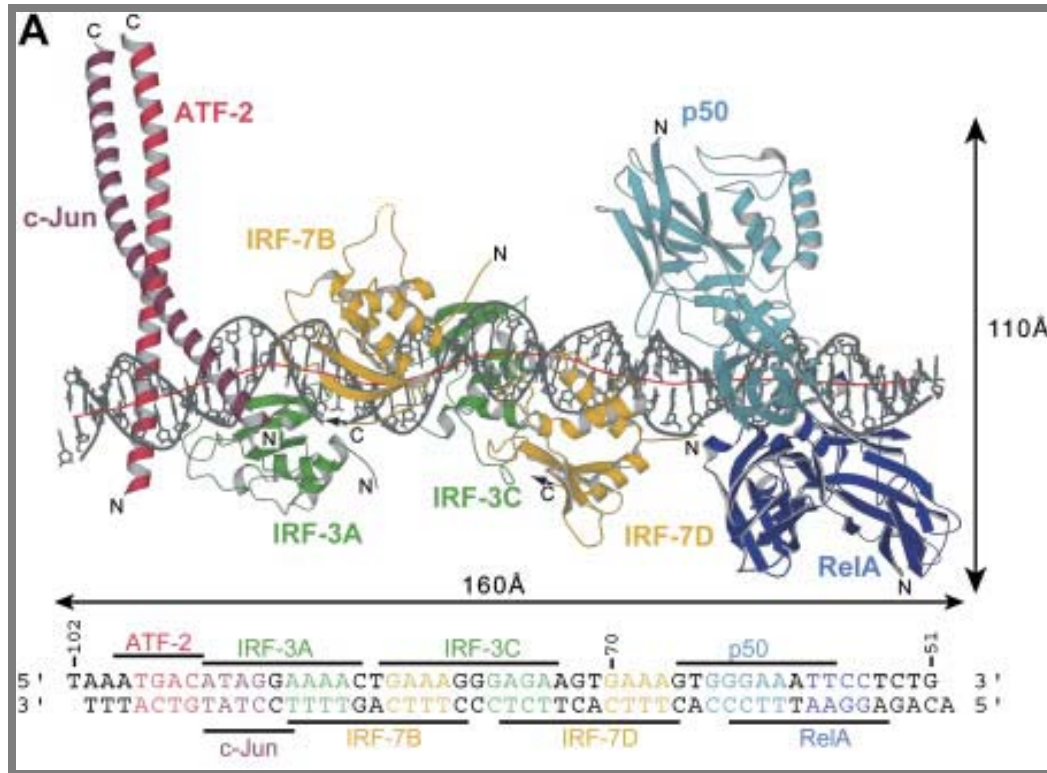
**Figure 3 :** Les grandes étapes de l'activation de NFκB

La détection d'un pathogène entraîne l'activation d'une voie de signalisation qui aboutit à la formation du complexe IKKα, β et γ phosphorylé qui permet la phosphorylation de la protéine inhibitrice IκB et sa dégradation au protéasome. Le complexe NFκB actif peut par la suite migrer au noyau et activer la transcription de ses gènes cibles en se fixant aux sites κB de leurs promoteurs. Le phosphate en vert fait référence à la phosphorylation résultant en une régulation négative de la protéine ciblée (IκB) alors que le phosphate jaune indique une activation par ubiquitination. Mentionnons également que chaque étape peut être modifiée et régulée par différents signaux; soulignons entre autre l'existence de cibles à fonction régulatrice pour le complexe IKK qui peuvent affecter l'activité transcriptionnelle de NFκB, ou encore de certains cofacteurs activant des événements régulateurs, dont des boucles d'amplification négative et des systèmes de terminaison de l'activation de NFκB. Figure tirée de (Ghosh et Hayden, 2008).

### 1.2.3 Contrôle transcriptionnel des interférons de type I

La transcription de l'*IFNβ* est rapidement induite suite à une infection virale ou suite à la détection par l'organisme d'un autre stimuli, bactérien ou stress, et ce grâce à l'attachement coopératif de trois familles de facteurs de transcription, incluant NFκB, ATF2/c-Jun et les IRFs, au niveau des PRDs (Positive Regulation Domains) du promoteur du gène *Ifnb1*. Cette région de l'*IFNβ* contient au moins 4 domaines de régulation en *cis*: les PRD I, II, III et IV (Kim et Maniatis, 1997). Par contre, les régions promotrices des *IFNα* ne contiennent que les domaines PRDI et PRDIII (Ryals et al., 1985). Ces derniers sont les sites d'attachement des membres de la famille des IRFs, alors que les PRDII et IV sont réservés à l'attachement de NFκB et AP-1 (formé d'un hétérodimère d'ATF2 et de c-jun). Le PRDI est aussi un site de reconnaissance pour le PRDI-BF1 (PRDI-Binding Factor), qui agit comme régulateur négatif de la transcription de l'*IFNβ* (Gyory et al., 2004).

Suite à une infection virale, les IRFs, NFκB, AP-1 ainsi que HMG-I(Y) se retrouvent au niveau de leur site d'attachement respectif et forment un complexe appelé « enhanceosome » (Kim et Maniatis, 1997) (**Fig. 4**). Ce complexe recrute également des histones acétyl transférases comme GCN5 (general-control-of-amino-acid synthesis 5) ainsi que la protéine d'attachement à CREB (CREB-binding protein (CBP)). Suite à l'acétylation des résidus lysine des histones H3 et H4 du nucléosome, le site du début de transcription au niveau du promoteur de l'*IFNβ* se retrouve libéré, ce qui facilite le recrutement du complexe de transcription TFIID au niveau du promoteur, un événement essentiel pour l'induction de la transcription de l'*Ifnb1* (Agalioti et al., 2000).



**Figure 4:** Vue d'ensemble de la structure de l'enhanceosome de l'*IFNβ*

Figure tirée de (Panne et al., 2007).

### 1.2.4 La voie classique des interférons

Tous les IFNs de type I s'attachent à un récepteur hétérodimérique commun (composé du produit des gènes *IFNAR1* et *IFNAR2*), ce qui induit son oligomérisation. Avant son activation induite par la liaison de molécules d'IFN, la queue cytoplasmique du récepteur IFNAR1 est associée à Tyk2 alors que la sous-unité IFNAR2 est associée à Jak1. STAT2 est aussi attaché à IFNAR2 et faiblement associé à STAT1 (Precious et al., 2005; Stancato et al., 1996; Tang et al., 2007). La liaison du ligand induit une dimérisation du récepteur, causant un changement de conformation de manière à ce que Tyk2 phosphoryle la tyr466 sur IFNAR1 puis phosphoryle STAT2 sur la tyr690. STAT1 est quant à lui phosphorylé par Jak1 sur la tyr701. Les STAT1 et 2 ainsi phosphorylés forment un hétérodimère stable. En parallèle, en réponse à la stimulation par l'IFN, le co-facteur transcriptionnel CBP est recruté à la sous-unité IFNAR2 et catalyse son acétylation. Cet événement permet le recrutement d'IRF9 qui sera lui-même acétylé tout comme STAT1 et STAT2. Il semblerait que l'acétylation des membres du complexe ISGF3 formé par STAT1, STAT2 et IRF9 soit importante pour l'assemblage de ce dernier (Tang et al., 2007). Le complexe STAT1-STAT2 associé avec un monomère d'IRF9 forme le complexe ISGF3

hétérotrimérique qui attachera par la suite les régions ISRE retrouvées au niveau des promoteurs de la plupart des gènes inductibles par les IFNs de type I.

Ainsi, les IFN $\alpha$  et  $\beta$  synthétisés pourront se fixer aux récepteurs IFNAR à la surface d'une même cellule (fonction autocrine) ou de cellules voisines (fonction paracrine), permettant ainsi d'initier une deuxième vague de production d'IFNs (Loo et Gale, 2007; Reich, 2007; van Boxel-Dezaire et al., 2006). Cette seconde vague permet la transcription entre autre d'IRF7, de multiples sous-type d'IFN $\alpha$  et de centaines d'ISGs, engendrant ainsi un état antiviral dans les cellules infectées environnantes (Tenoever et al., 2007; Tenoever et al., 2004).

La voie de signalisation suite à l'engagement des IFNs de type III au niveau de leur récepteur est assez similaire à celle des IFNs de type I (Zhou et al., 2007). Pour ce qui est du récepteur à IFN $\gamma$ , il s'agit aussi d'une glycoprotéine hétérodimérique constituée de 2 sous-unités : IFNGR1 et IFNGR2 qui sont associées à JAK1 et JAK2 respectivement. Deux molécules de STAT1 interagissent par leur domaine SH2 avec IFNGR1 et sont ensuite phosphorylées. STAT1 activé dimérise, migre au noyau puis s'attache à la séquence GAS au niveau du promoteur stimulant ainsi l'activation de la transcription (Randall et Goodbourn, 2008).

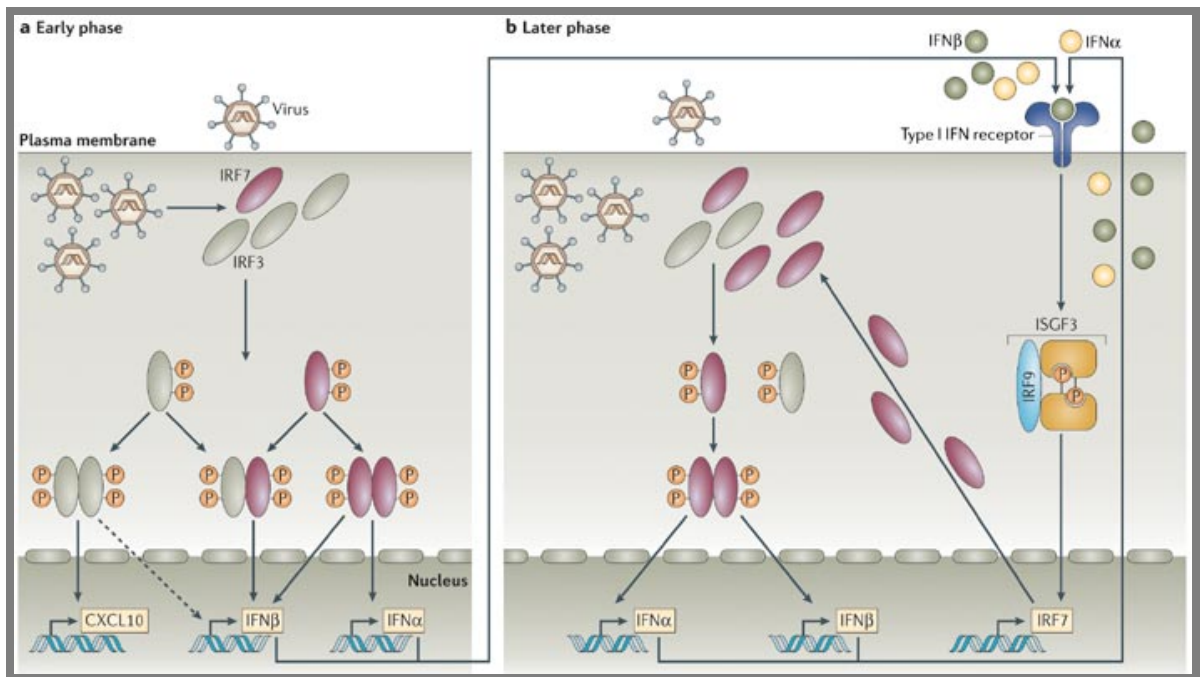
Si l'activation de l'hétérotrimère IRF9-STAT1-STAT2 est le mode d'activation canonique des promoteurs comportant des ISREs, il existe d'autres modes d'activation des ISGs par des facteur de transcription alternatifs, plus spécifiques à certains promoteurs ou avec des profils de cinétiques différents (van Boxel-Dezaire et al., 2006). Ainsi, *ADAR-1*, *IFIT3* et *OAS1* possèdent une séquence ISRE dans leurs promoteurs mais leur activation dépend également de la phosphorylation de STAT1 sur la ser708 par IKK $\epsilon$  qui permet de stabiliser l'association entre ISGF3 et les ISRE (Tenoever et al., 2007). Citons aussi l'hétérotrimère IRF9-STAT1-STAT1 qui est activé par l'IFN $\gamma$  (Bluyssen et al., 1995) et qui active plusieurs promoteurs contenant des régions ISRE comme la chemokine CXCL10 (Majumder et al., 1998).

## **1.2.5 La réponse antivirale précoce : bref survol**

### **1.2.5.1 Modèle proposé**

Un premier modèle dit biphasique a été proposé pour expliquer les premiers événements suite à la détection d'un pathogène: IRF3 serait principalement responsable de la synthèse des IFN $\beta$  et IFN $\alpha$ 4 au cours d'une phase précoce ne nécessitant aucune synthèse protéique, alors qu'IRF7, dont l'induction dépendrait de la première vague d'IFN $\beta$ , serait indispensable pour l'induction des

IFN $\alpha$  au cours d'une phase dite tardive qui dépendrait par contre d'une synthèse protéique. Pourtant, des observations chez des MEFs provenant de souris IRF7<sup>-/-</sup> ont démontré que la présence d'IRF7 était également fondamentale pour la phase précoce (Honda et al., 2005). Un deuxième modèle est donc né (**Fig. 5**), dans lequel des dimères d'IRF7 ou des hétérodimères IRF3/IRF7 pourraient intervenir dès la phase précoce, et ce en dépit de la faible quantité d'IRF7 exprimée de façon constitutive dans des cellules non-immunitaires (Honda et al., 2006; Honda et Taniguchi, 2006).



**Figure 5:** Boucle d'amplification positive de la voie des interférons de type I

Très tôt au cours de l'infection avec un virus à ARN ou ADN, les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 sont phosphorylés ce qui résulte en leur homo ou hétérodimérisation. Ces dimères migrent au noyau et induisent l'expression de chémokines et d'IFN $\alpha/\beta$ . Ces IFNs sécrétés pourront s'attacher à leur récepteur commun de façon autocrine ou paracrine et activer la cascade de signalisation menant à la translocation du complexe ISGF3 au noyau; des molécules d'IRF7 supplémentaires seront ainsi synthétisées. Cette boucle d'amplification permettra la synthèse d'une grande quantité d'IFN de type I ainsi que d'ISGs comme *PKR*, *OASL* ou la *Viperin*. Figure adaptée de (Honda et Taniguchi, 2006).

### 1.2.5.2 Quelques gènes antiviraux et leur fonction

Le traitement de cellules avec de l'IFN $\alpha/\beta$  induit l'expression de plusieurs centaines de gènes permettant d'établir un état antiviral dans la cellule. Parmi ces gènes, on retrouve entre autre ceux codant pour *PKR*, *2'5'OAS*, *Mx*, *ISG15*, *54* et *56*, *ADAR*, la *Viperin* et bien d'autres. La protéine *PKR* est synthétisée sous une forme inactive qui dimérise et s'active en réponse à l'ARNdb produit au cours de la réplication virale. Le substrat de *PKR* le mieux caractérisé est le facteur d'initiation de la synthèse protéique *eIF2 $\alpha$* , dont la phosphorylation par *PKR* prévient le recyclage,



inhibant ainsi la synthèse protéique (Meurs et al., 1992). Notons également que la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  peut activer l'autophagie, ce qui limite également la réplication virale (Talloczy et al., 2002; Talloczy et al., 2006).

Tout comme PKR, la protéine OAS est synthétisée sous une forme inactive et utilise l'ARNdb comme cofacteur. La liaison à l'ARNdb permet à OAS d'oligomériser l'ATP à travers un lien 2'5' phosphodiester. Le 2'5' oligoadénylate ainsi formé active la nucléase latente RNase L qui dégrade les ARNs viraux et cellulaires (Meurs et al., 1985; Stark et al., 1998). La RNase L est d'ailleurs impliquée dans une boucle d'amplification de la réponse immunitaire innée, puisqu'en générant de nouvelles molécules d'ARNsb par clivage d'ARN du Soi, elle permet de réactiver les voies de signalisation en amont.

La famille des gènes Mx encode pour de larges GTPases dont la fonction exacte n'est pas encore tout à fait définie, mais qui présente une fonction antivirale envers une grande variété de virus. Les protéines Mx agissent suite à la reconnaissance de structures appartenant à la nucléocapside virale et permettent de restreindre ces structures à l'intérieur de la cellule, interférant alors avec la propagation du virus. Par exemple, la protéine MxA reconnaît la nucléoprotéine du virus Thogoto (THOV) et prévient le transport de la nucléocapside entrante vers le noyau (Weber et al., 2000).

En plus de PKR, OAS et des protéines Mx, les protéines de type ISG fortement induites en réponse à l'IFN jouent également un rôle antiviral fondamental. ISG15, l'une des protéines les plus induites au cours de la réponse antivirale est semblable à l'ubiquitine, s'attachant de façon covalente à de nombreuses protéines cellulaires et permettant entre autre de stabiliser certaines protéines en empêchant leur dégradation (Giannakopoulos et al., 2005; Zhao et al., 2005). L'ISG15 est sécrétée par les cellules et agit comme une cytokine. Le rôle d'ISG15 dans la réponse antivirale a été décrit au cours de l'étude de souris déficientes pour Ubp43 (Usp18), une enzyme qui permet de détacher l'ISG15 de ses substrats. Ces souris s'avèrent être extrêmement sensibles à l'IFN (Malakhova et al., 2003) et deviennent résistantes à plusieurs virus (Ritchie et al., 2004). De la même façon, un siRNA dirigé contre *USP18* augmente la capacité inhibitrice de l'IFN dans un modèle d'infection avec le VHC (Randall et al., 2006). À l'inverse, des souris déficientes en ISG15 sont beaucoup plus susceptibles aux infections virales (Lenschow et al., 2007). Notons que plusieurs des substrats ciblés par ISG15 jouent des rôles cruciaux dans la réponse immunitaire innée, comme JAK1, STAT1 (Malakhov et al., 2003), PKR, MxA, RIG-I (Zhao et al., 2005) et IRF3 (Lu et al., 2006).

Les protéines ISG54 et ISG56 sont des protéines de la même famille dont la fonction est d'inhiber la traduction en interagissant avec le complexe multiprotéique d'initiation de la traduction, eIF3 (Guo et al., 2000) inhibant ainsi sa capacité à stabiliser le complexe eIF2-GTP-tRNAi<sup>met</sup> (Hui et al., 2003).

ADAR appartient à la famille des adénosines désaminases, comme ADAR1-L qui peut désaminer les adénosines au niveau des régions d'ARNdb afin de générer des inosines, ce qui engendre des mutations dans l'ARN viral (Cattaneo, 1994; Zahn et al., 2007).

La Vipérine, quant à elle, possède une puissante activité antivirale contre le virus HCMV (Chin et Cresswell, 2001) ou encore le VHC (Helbig et al., 2005). Son mode d'action est obscure, cela dit, il a été récemment démontré que son expression empêcherait, en s'attachant et en inhibant une enzyme responsable de la biosynthèse de lipides dérivés de l'isoprénolide, la formation de complexes lipidiques appelés « lipid rafts », importants pour l'assemblage et le bourgeonnement de certains virus (Wang et al., 2007).

Rappelons également que les IFNs jouent un rôle-clé dans l'établissement d'un état pro-apoptotique dans les cellules cibles, aidant ainsi à éliminer les cellules infectées (Clemens, 2003; Maher et al., 2007). De plus, les IFNs ont des fonctions antiprolifératives et cytostatiques, permettant d'arrêter la croissance en phase G1/S du cycle cellulaire (Ferrantini et al., 2007). Finalement, les IFNs de type I ont également des fonctions immunomodulatrices, en augmentant par exemple l'expression des molécules du CMH-I ainsi que celle des composants de la machinerie de présentation de l'antigène. Les IFNs ont donc un rôle important dans la transition de l'immunité innée vers l'immunité acquise (Le Bon et Tough, 2002). Par ailleurs, les IFNs participent à l'activation des cellules NK en favorisant l'induction de perforines et de granzymes (Bolitho et al., 2007).

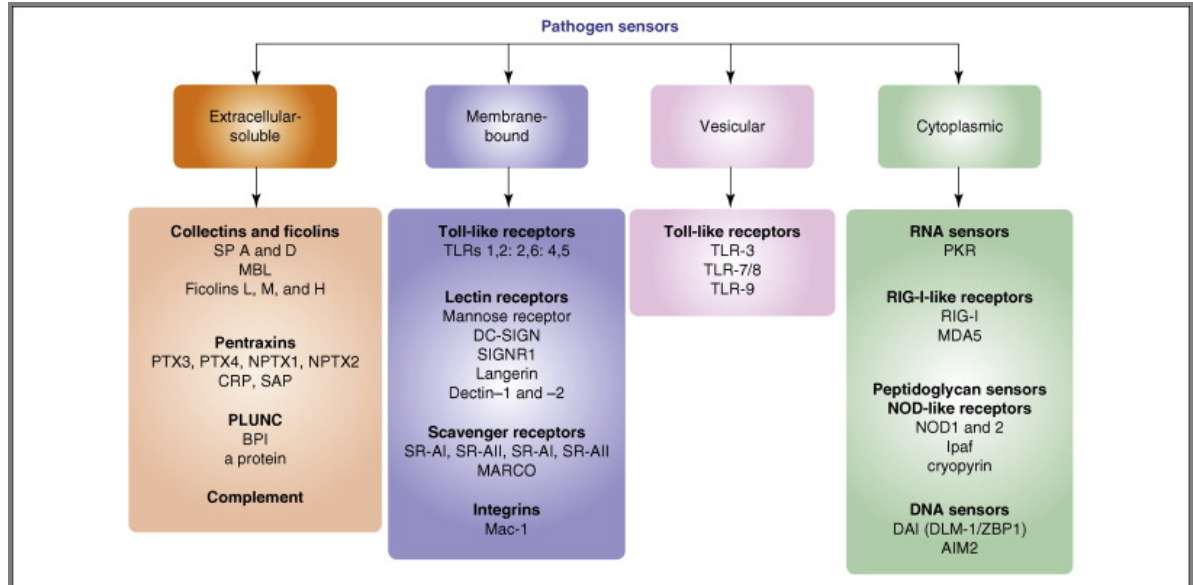
## **1.3 Reconnaissance des pathogènes viraux par l'hôte et voies de signalisation**

### **1.3.1 Rôle et grandes catégories de PRRs**

La reconnaissance de PAMPs par les PRRs engendre une réponse pro-inflammatoire et antimicrobienne par le biais de l'activation d'une multitude de voies de signalisation intracellulaires, faisant intervenir des récepteurs, leurs molécules adaptatrices, des protéines kinases

ainsi que des facteurs de transcription à l'origine de la synthèse d'une large variété de molécules incluant des cytokines, des chemokines, des molécules d'adhésion cellulaire et des immunorécepteurs qui permettront ensemble d'orchestrer à la fois une réponse innée immédiate, mais aussi l'élaboration d'une réponse acquise plus tardive (Akira et Takeda, 2004; Akira et al., 2006; Mogensen, 2009).

Parmi les PRRs, on retrouve plusieurs catégories : les PRRs sécrétés, les PRRs membranaires ou encore les PRRs intracellulaires, ces derniers pouvant être cytosoliques ou vésiculaires, tel qu'indiqué à la **Fig. 6**. Les PRRs sécrétés sont représentés par plusieurs catégories de protéines aptes à détecter puis éliminer l'agent pathogène, comme c'est le cas au cours de l'activation du complément puis de l'opsonisation en vue de la phagocytose. Parmi ces PRRs on retrouve entre autres, le complément, les collectines, les pentraxines, les protéines de reconnaissance des peptidoglycannes dites « peptidoglycan-recognition proteins » ou encore les transférases à lipides dites « lipid transferases ». Pour ce qui est des PRRs membranaires, on retrouve certains membres de la famille des TLRs, les récepteurs aux lectines, les récepteurs de type « Scavenger » ou encore les intégrines. D'autres membres de la famille des TLRs, comme les TLR3, 7, 8 et 9 sont regroupés dans la catégorie des PRRs vésiculaires, étant principalement localisés au niveau des endosomes. Finalement, les récepteurs de type NOD, les membres de la famille des hélicases de type RIG-I ainsi que le récepteur à ARNdb cytoplasmique PKR se retrouvent dans la catégorie des PRRs cytoplasmiques.



**Figure 6:** Les grandes catégories de récepteurs de pathogènes ou PRRs

Les récepteurs reconnaissant des motifs spécifiques indiquant la présence de pathogènes dans l'organisme peuvent être regroupés sous différentes catégories selon leur localisation : extracellulaire ou sécrétée, membranaire, vésiculaire ou cytoplasmique. Figure tirée de (Ranjan et al., 2009).

### 1.3.2 L'ARN comme signature d'une infection virale

De façon générale, la présence d'ARNdb ou de motifs nucléiques spécifiques est un marqueur-clé témoignant d'une infection virale. Généralement absentes des cellules saines, les longues molécules d'ARNdb, leurs structures tige-boucle, leurs extrémités 5' triphosphorylées souvent non coiffées ainsi que certaines de leurs séquences nucléotidiques spécifiques peuvent être formées suite à la réplication d'un virus à ARN ou encore suite à la transcription d'un virus à ADN (Jacobs et Langland, 1996) et sont rapidement reconnues par les PRRs cytoplasmiques ou membranaires de l'hôte (Matsumoto et Seya, 2008; Yoneyama et Fujita, 2007, 2008; Yoneyama et al., 2008). En effet, de nombreux virus effectuent leur cycle de réplication complet dans le cytosol des cellules infectées (comme le VHC), alors que d'autres, comme le virus de l'influenza, se répliquent dans le noyau mais effectuent des navettes à travers le cytosol lors du relâchement des particules virales. Ainsi, les acides nucléiques dérivant de virus incluant l'ARNdb, mais aussi l'ARNsb et l'ADN, figurent à titre de PAMPs et sont reconnus par différents PRRs de l'hôte ce qui permettra l'induction des voies de signalisation menant à une réponse antivirale.

Deux grandes familles de PRRs sont reconnues pour leur rôle majeur dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux. La première est celle des TLRs, en particulier les

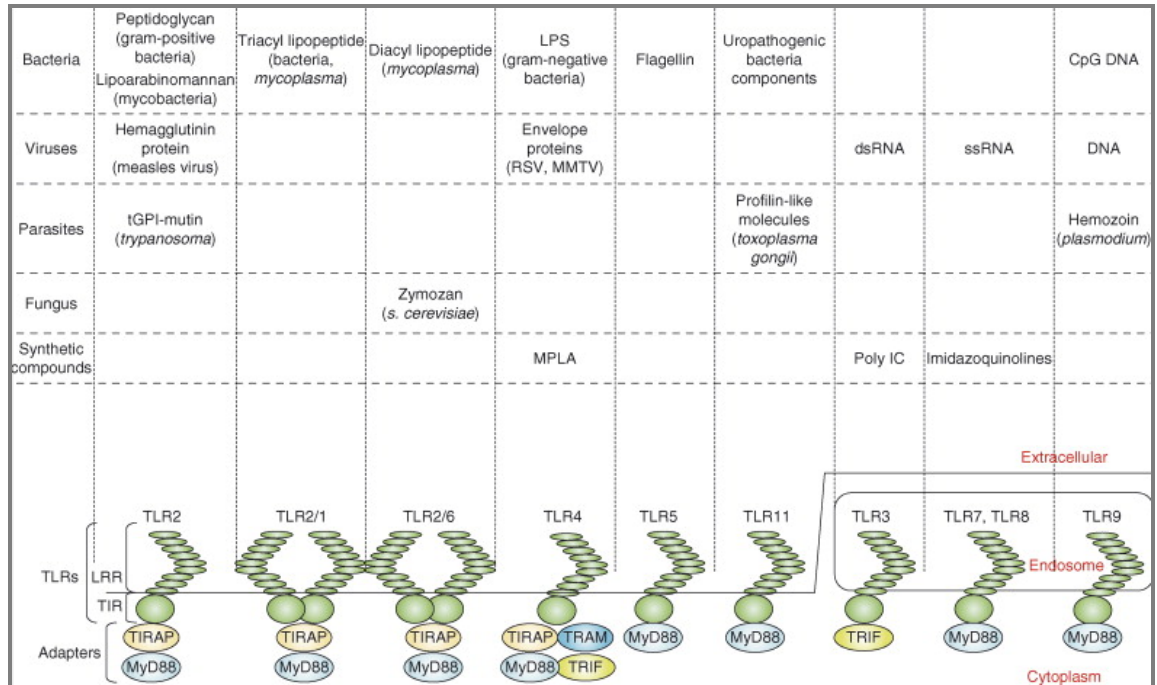
TLR3, TLR7, 8 et 9 qui sont principalement exprimés dans les endosomes de certains types cellulaires. La seconde comprend les récepteurs de la famille des RLRs, représentés par RIGI, MDA5 et LGP2 qui sont exprimés de façon ubiquitaire dans le cytoplasme.

### 1.3.3 Les TLRs antiviraux

#### 1.3.3.1 Présentation

Les TLRs représentent une catégorie de protéines très conservées, retrouvées chez les plantes, les insectes et les mammifères (Akira et al., 2006; Medzhitov, 2007). Ces récepteurs doivent leur nom à la protéine Toll, premièrement identifiée chez la *Drosophile* pour son rôle important dans l'immunité contre les infections fongiques (Brennan et Anderson, 2004). Ces protéines consistent en (1) un domaine ectamérique extracellulaire comprenant plusieurs répétitions de motifs riches en leucine par lesquels se fait la reconnaissance du ligand respectif, (2) un domaine transmembranaire qui détermine la localisation cellulaire, (3) un domaine cytoplasmique qui partage des similarités avec le domaine cytoplasmique du récepteur de l'IL-1 et qui porte le nom de domaine TIR (Toll/IL-1 Receptor homology domain). Suite à la reconnaissance d'un ligand, il y a dimérisation du récepteur, ce qui entraîne des interactions homotypiques entre le domaine TIR du récepteur et le domaine TIR des protéines adaptatrices en aval. Il existe cinq protéines adaptatrices à domaines TIR permettant la signalisation à partir des TLRs activés : MyD88, MAL ou TIRAP, TRIF, TRAM et SARM (O'Neill et Bowie, 2007). Jusqu'à présent, on dénombre treize TLRs chez les mammifères, avec différentes spécificités de liaison à leurs motifs respectifs. À l'exception du TLR3, les TLRs recrutent l'adaptateur MyD88, qui est associé à des membres de la famille des protéines IRAK et qui participe à la voie de signalisation (**Fig. 7**). Le TLR3 utilise l'adaptateur TRIF pour initier la cascade d'activation en aval.

À l'intérieur de la famille des TLRs, les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 représentent une sous-famille qui est localisée dans des compartiments intracellulaires comme les endosomes tardifs, les lysosomes ou le réticulum endoplasmique, et qui est destinée à reconnaître les acides nucléiques viraux contrairement aux autres TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6) qui sont localisés à la surface de la cellule et qui reconnaissent principalement les composantes des membranes bactériennes ou encore des particules virales. L'objectif de cette restriction particulière de reconnaissance du ligand à un compartiment cellulaire donné n'est pas seulement d'augmenter les chances de rencontre PRRs-PAMPs, mais également de diminuer les possibilités d'activation aberrantes des TLRs par des molécules du Soi.



**Figure 7:** Les TLRs, leurs ligands et leurs adaptateurs

Chaque TLR détecte un PAMP distinct dérivé de différents pathogènes microbiens comme les virus, les bactéries, les protozoaires et les champignons (Akira et al., 2006). Ces produits microbiens incluent entre autres les lipopolysaccharides bactériens (TLR4), les lipoprotéines (TLR2), la flagelline (TLR5), l'ADN CpG (TLR9), l'ARN viral simple brin (TLR7) ou encore l'ARNdb viral (TLR3). Ces TLRs sont exprimés par des cellules immunitaires variées comme les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules B et les neutrophiles, ainsi que par les fibroblastes, les cellules épithéliales et les kératinocytes. Notons également que les TLR3, 7, 8 et 9 sont localisés dans les endosomes, alors que les autres TLRs sont localisés au niveau de la membrane extracellulaire. Les TLR1, 2 et 6 utilisent MyD88 et TIRAP comme adaptateurs alors que les TLR5, 7, 9 et 11 utilisent MyD88. Le TLR4 utilise MyD88, TIRAP, TRIF et TRAM alors que TLR3 n'utilise que TRIF. Figure tirée de (Kawai et Akira, 2007).

### 1.3.3.2 Les TLR7, 8 et 9

#### 1.3.3.2.1 Définitions et ligands

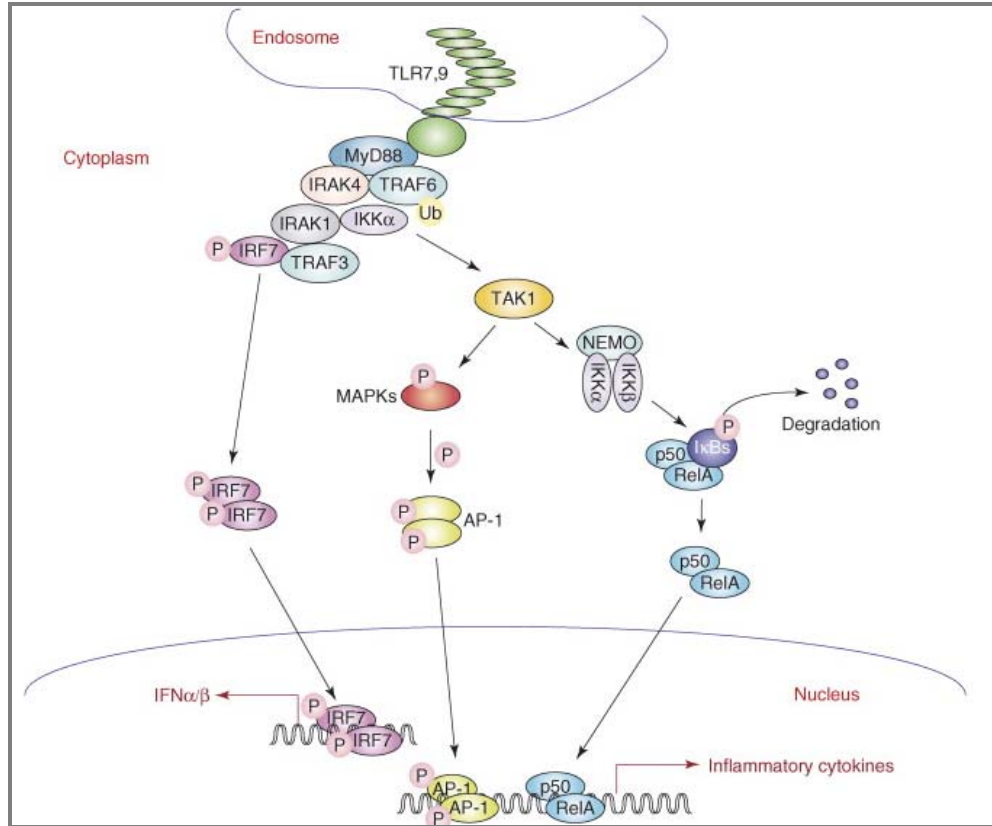
Dans la famille des TLRs, les TLR3, 7, 8 et 9 sont les récepteurs responsables de la détection des acides nucléiques et sont localisés au niveau du compartiment intracellulaire. Chez l'humain, les TLR7 et 8 reconnaissent l'ARNsb, contrairement à la souris où seul le TLR7 reconnaît l'ARNsb. Les TLR7 et 9 sont principalement exprimés dans les DCs plasmacytoïdes (pDCs) et les cellules B (Colonna et al., 2004; Liu, 2005).

TLR7 a initialement été identifié par sa capacité à reconnaître les dérivés de l'imidazoquinoline, comme l'imiquimod et le résiquimod (R-848), ainsi que les analogues de la guanine comme la loxoribine (Hemmi et al., 2002). Par la suite, les ARNsb riches en résidus guanosine et uridine dérivés du VIH ainsi que du virus de l'influenza ont été identifiés comme les

ligands naturels du TLR7 (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004). De plus, le TLR7 reconnaît certains ARNs synthétiques à séquence poly(U) ainsi que certains siRNAs (Hornung et al., 2005). Le TLR8 est phylogénétiquement le plus proche du TLR7 et reconnaît préférentiellement les ARNs dérivés du VIH ainsi que le R-848 chez l'homme, mais pas chez la souris (Diebold et al., 2004; Hemmi et al., 2004). Le TLR9 reconnaît l'ADNsb, incluant l'ADN CpG non méthylé de type A et B, qui est le plus souvent présent chez la bactérie et plus rare chez l'humain, permettant ainsi la détection de l'ADN d'origine bactérienne et virale (Hemmi et al., 2000). Ainsi, le TLR9 est capable de détecter le HSV1 et 2 ou encore le MCMV (Krug et al., 2004a; Krug et al., 2004b; Lund et al., 2003).

#### 1.3.3.2.2 *Voie de signalisation*

TLR7/8 et 9 détectent les acides nucléiques au niveau des endolysosomes. Les voies de signalisation via ces trois TLRs reposent sur le recrutement de l'adaptateur MyD88. L'activation de ce dernier mène à son association avec TRAF6 (Gohda et al., 2004; Hacker et al., 2006). TRAF6 active par la suite la protéine TAK1, qui recrute le complexe NEMO/IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ , aboutissant alors à l'activation de NF $\kappa$ B et à l'expression de molécules de co-stimulation, de cytokines, de chemokines comme IP10, IL6 et IL12 ainsi qu'à la promotion des cellules T-helper. En parallèle, une interaction entre TRAF3 et le complexe MyD88-IRAK1-IRF7 permettrait quant à elle la phosphorylation d'IRF7, menant à une forte production d'IFNs de type I, en particulier dans les pDCs qui expriment IRF7 de façon constitutive (Honda et al., 2005; Kim et al., 2007; Yang et al., 2005) (**Fig. 8**). Mentionnons que des interactions entre IRF7, MyD88, IRAK4 et TRAF6 ont également déjà été démontrées (Honda et al., 2004; Kawai et al., 2004), tout comme la phosphorylation d'IRF7 par IRAK1 qui jouerait un rôle majeur (Uematsu et al., 2005). Par ailleurs, des pDCs obtenues à partir de souris déficientes en TRAF3 auraient des défauts de production d'IFN $\alpha$  (Hacker et al., 2006; Oganessian et al., 2006).



**Figure 8:** Voies de signalisation médiées par les TLR7 et 9

Les TLR7 et 9 sont exprimés dans les compartiments endosomaux. Ces deux TLRs stimulent la voie de signalisation médiée par l'adaptateur MyD88 régulant ainsi les réponses inflammatoires via l'activation de TAK1 et des MAPK. Dans les pDCs, le facteur IRF7 forme un complexe de signalisation avec MyD88, IRAK4, TRAF6, IRAK1 et IKK $\alpha$ . En réponse à une stimulation par un ligand, IRF7 est phosphorylé par IRAK1 et IKK $\alpha$ , dimérise puis est transloqué au noyau afin d'y réguler l'expression des IFN $\alpha/\beta$ . Figure tirée de (Kawai et Akira, 2007).

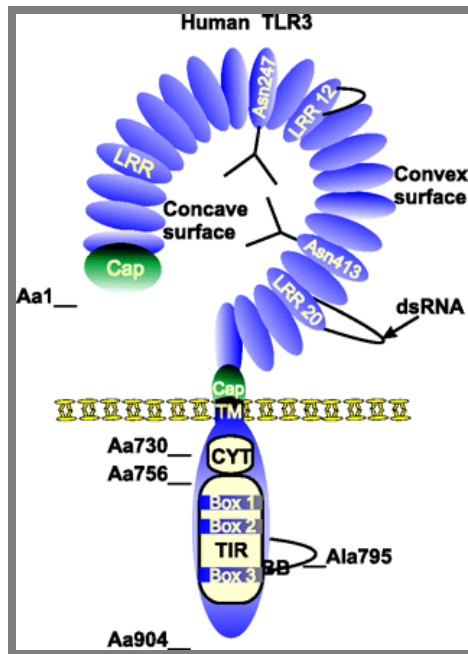
### 1.3.3.3 Le TLR3

#### 1.3.3.3.1 Rôle et structure

Comme les autres TLRs, TLR3 est un récepteur transmembranaire de type I, composé d'un domaine riche à répétitions leucines (LRRs), un domaine transmembranaire, ainsi qu'une queue cytoplasmique contenant un domaine TIR conservé (**Fig. 9**). C'est le domaine extracellulaire du TLR3, consistant en vingt-trois LRRs, qui permet l'attachement du ligand. Le domaine transmembranaire consiste en une hélice  $\alpha$  unique à travers la membrane, alors que le domaine TIR est fait de cinq feuilletts  $\beta$  entourés de cinq hélices  $\alpha$ . Ces éléments de structures secondaires sont connectés par des boucles, dont la boucle BB qui est responsable de l'interaction avec les molécules adaptatrices des TLRs. Contrairement à tous les autres TLRs qui contiennent un résidu proline



conservé, le TLR3 possède une alanine qui est responsable de son interaction avec l'adaptateur TRIF et non MyD88, l'adaptateur commun à tous les autres TLRs.



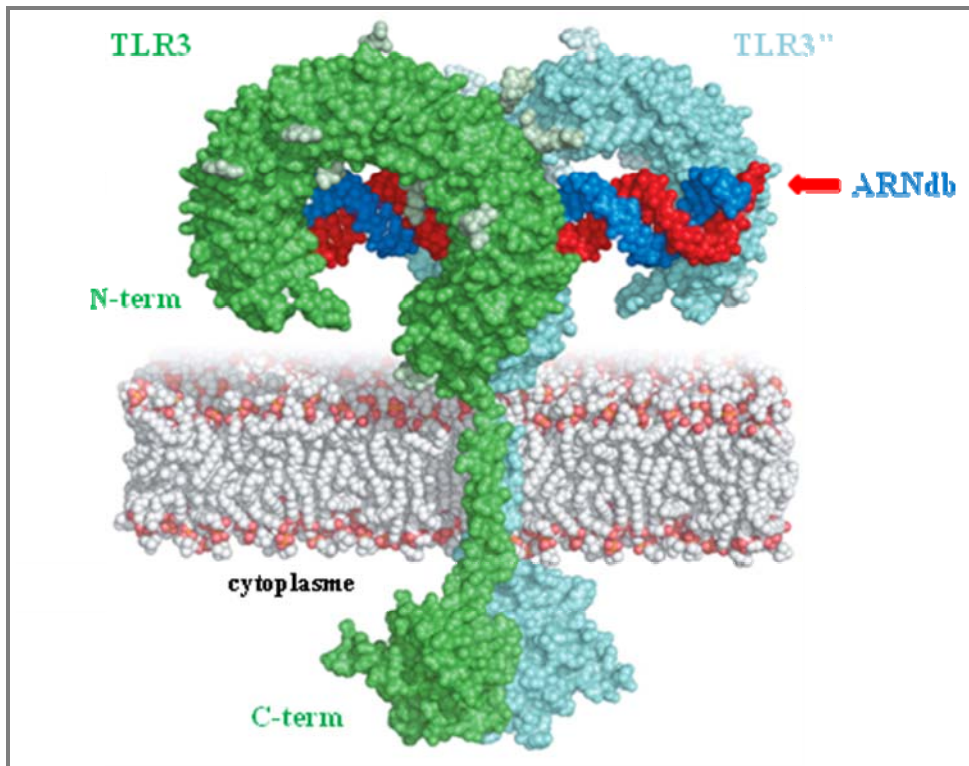
**Figure 9:** Structure du TLR3

Le TLR3 est une protéine membranaire intégrale de 904 aa. Le domaine extracellulaire est en fer à cheval et regroupe les LRRs qui forment le solénoïde. La surface concave est riche en sites de N-glycosylation. Le domaine transmembranaire est formé d'une seule hélice  $\alpha$ . Le domaine cytoplasmique comprend la région du linker (CYT) (Cytoplasmic Linker Region) et le domaine TIR. L'alanine conservée Ala795 se retrouve en haut de la boucle BB et est impliquée dans la liaison à TRIF. Figure tirée de (Vercammen et al., 2008).

Le rôle du TLR3 dans la reconnaissance de l'ARNdb a initialement été démontré chez une souris déficiente en TLR3 chez laquelle on a détecté une production réduite d'IFNs de type I et de cytokines pro-inflammatoires en réponse à une stimulation avec de l'ARN génomique purifié à partir de virus à ARNdb comme les Réovirus ou encore avec du poly(I:C) (Alexopoulou et al., 2001). Le TLR3 serait responsable de la reconnaissance d'ARNdb produit au cours de la réplication de virus à ARNsb comme le RSV, l'EMCV et le WNV (Wang et al., 2004a). De plus, il a également été démontré que le TLR3 pouvait détecter la présence de siRNA de façon indépendante de sa séquence et pouvait induire la production d'IL12 et d'IFN $\gamma$  (Kleinman et al., 2008). L'importance du TLR3 dans les infections virales chez l'homme a aussi été soulignée par l'association entre une susceptibilité à l'infection causée par le HSV1 et la déficience en TLR3 (Zhang et al., 2007).

Des études récentes de cristallographie ont permis de déterminer la structure en fer à cheval caractéristique de la région des LRRs abondamment glycosylée (Bell et al., 2006; Choe et al.,

2005). Il a été suggéré que cette dernière région permettrait un contrôle de l'attachement de l'ARNdb. Un modèle de dimérisation du TLR3 a été proposé (Oshiumi et al., 2003), dans lequel le statut de glycosylation du domaine extracellulaire ainsi que les caractéristiques intrinsèques du ligand (longueur de l'ARNdb) permettraient une activation du récepteur. Ainsi, de longues molécules de poly(I:C) seraient plus aptes à activer le TLR3 (Alexopoulou et al., 2001; Schulz et al., 2005). Lors de la reconnaissance de l'ARNdb par le TLR3, le ligand interagirait à la fois avec les sites N et C-terminaux sur le côté latéral de la surface convexe du récepteur, ce qui permettrait l'activation de la cascade en aval (**Fig. 10**) (Jin et Lee, 2008; Liu et al., 2008).



**Figure 10:** Modèle de l'interaction entre le TLR3 et son ligand d'ARNdb

La proximité des deux extrémités C-terminales des TLR3 dimérisés permet l'association des hélices transmembranaires et la dimérisation des domaines TIR cytoplasmiques. Les résidus chargés positivement au niveau des régions terminales du TLR3 permettent l'interaction avec le squelette sucre-phosphate de l'ARNdb. En fait, les liens permettant la dimérisation du TLR3 sont surtout formés par l'interaction protéine-ligand. Figure tirée de (Liu et al., 2008).

#### 1.3.3.3.2 Localisation

Les études menées par le groupe de Matsumoto démontrèrent que l'anticorps TLR3.7 interférait avec la production d'IFN $\beta$  suite à l'ajout de poly(I:C) extracellulaire dans des fibroblastes, impliquant donc une localisation en surface du TLR3 dans ce type cellulaire (Matsumoto et al., 2003; Matsumoto et al., 2002). Par contre, dans les DCs myéloïdes (mDCs), le

TLR3 a été localisé au niveau de compartiments intracellulaires, en particulier dans les endosomes. La démonstration que les mDCs répondent au poly(I:C) extracellulaire par leurs TLR3 localisés au niveau des endosomes précoces fut également confirmée plus tard (de Bouteiller et al., 2005; Funami et al., 2004). Une localisation endosomale ou lysosomale du TLR3 permettrait en effet de distinguer le Soi du non-Soi. En effet, l'ARNdb présent dans des débris cellulaires provenant de cellules mortes pourrait être délivré aux endosomes, permettant ainsi de signaler la présence de non-Soi. Ainsi, le rôle de reconnaissance par le TLR3 de l'ARNdb phagocyté et enveloppé par une membrane cellulaire est maintenant largement reconnu (Ebihara et al., 2008).

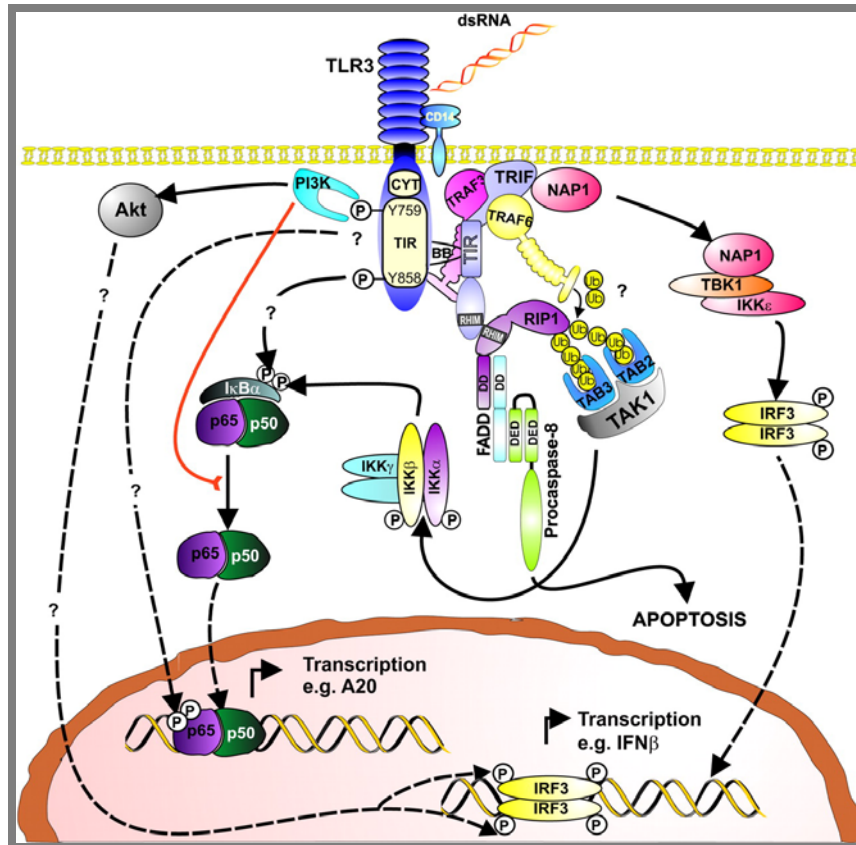
#### *1.3.3.3 Voie de signalisation*

L'activation de la voie de signalisation médiée par le TLR3 aboutit à l'activation des facteurs de transcription-clé IRF3 et NFκB (**Fig. 11**). La détection d'ARNdb par le TLR3 engendre la phosphorylation de deux tyrosines spécifiques (Tyr759 et Tyr858) au niveau de sa queue cytoplasmique ainsi que le recrutement de la kinase PI3K (Sarkar et al., 2004; Sarkar et al., 2003). L'étape de phosphorylation en Tyr759 serait essentielle à l'activation de la kinase Akt, permettant ainsi l'obtention d'une activation complète d'IRF3 sans laquelle ce dernier ne serait qu'incomplètement phosphorylé. Il a également été rapporté que la kinase à tyrosine c-Src est activée par le poly(I:C) et s'associe avec le TLR3, favorisant l'activation d'IRF3 par l'ARNdb (Johnsen et al., 2006). Suite à ces phosphorylations, le TLR3 dimérise et interagit par son propre domaine TIR avec celui de TRIF, lui-même constitué d'une région N-terminale (1-234), d'un domaine TIR (235-500), et d'une région C-terminale (501-680) (Yamamoto et al., 2003). Par la suite, l'association entre TRIF et NAP1 permet l'activation des deux kinases TBK-1 et IKKε, menant ainsi à la translocation au noyau d'IRF3 (**Fig. 11**) (Sasai et al., 2005). En plus de NAP1, il a été démontré que la protéine TRAF3 faisait également partie du complexe IKKε/TBK-1 co-précipitant avec TRIF. En effet, des cellules déficientes en TRAF3 seraient inapte à produire de l'IFNβ (Hacker et al., 2006; Oganessian et al., 2006).

L'activation de NFκB nécessite également la phosphorylation des deux résidus Tyr759 et Tyr858 du TLR3 (Sarkar et al., 2007). Alors que le premier signal mène à la phosphorylation d'IκB, permettant le relâchement et la translocation au noyau de NFκB, le second permettrait la phosphorylation de p65 et sa transactivation. Par contre, bien que PI3K ait un rôle essentiel dans l'activation d'IRF3, il n'est pas indispensable à celle de NFκB comme démontré par l'absence d'effet d'un inhibiteur de PI3K sur l'expression du gène A20, dont la transcription est NFκB-dépendante (Sarkar et al., 2007; Sarkar et al., 2004). En fait, PI3K aurait plutôt un rôle d'orientation

de la voie de signalisation de TLR3 vers une réponse de type IRF3 plutôt que vers une réponse pro-inflammatoire dépendante de NF $\kappa$ B.

Toujours en ce qui concerne la voie de signalisation menant à l'activation de NF $\kappa$ B, deux voies distinctes médiées respectivement par RIP1 et TRAF6 bifurquent au niveau de l'adaptateur TRIF. L'interaction entre RIP1 et TRIF est médiée par le motif homotypique RHIM se retrouvant à la fois dans la portion C-terminale de TRIF et dans le domaine intermédiaire de RIP1. TRAF6 est quant à lui recruté au niveau du domaine N-terminal de TRIF, mais son rôle est encore controversé et probablement restreint à certains types cellulaires. Cela dit, il a été démontré, que dans des fibroblastes provenant d'embryons de souris, TRAF6 serait recruté par TRIF en présence de RIP1, ce qui serait suivi par une étape de polyubiquitination de RIP1 (Cusson-Hermance et al., 2005). RIP1 serait alors apte à recruter TAB2, TAB3 et TAK1 qui phosphorylent à leur tour IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , menant à la dégradation de I $\kappa$ B et au transfert de NF $\kappa$ B au noyau (**Fig. 11**). TAK1 activerait également la protéine c-Jun ainsi que la kinase p38, menant à la phosphorylation et à l'activation des membres de la famille AP-1.



**Figure 11:** Voie de signalisation de TLR3

L'attachement de l'ARNdb au TLR3 induit l'activation de plusieurs voies de signalisation. L'activation de NFκB et d'IRF3 dépend de deux voies majeures en aval de l'adaptateur TRIF qui interagit avec la boucle BB du domaine TIR de TLR3. Des régions distinctes de TRIF permettent le recrutement de TRAF6 et de RIP1. L'ubiquitination de RIP1 par TRAF6 mène à la reconnaissance de RIP1 par TAB2 et TAB3 ce qui active la kinase TAK1. Cette dernière phosphoryle et active IKKα et IKKβ ce qui permet l'activation de NFκB et sa translocation au noyau. TRIF interagit également avec NAP1 et TRAF3 qui auront pour fonction d'activer les kinases IKKε et TBK-1 à l'origine de la phosphorylation et de la dimérisation d'IRF3 alors apte à migrer au noyau. La phosphorylation d'IRF3 est aussi dépendante de la kinase Akt qui est activée par PI3K, cette dernière interagissant avec la phospho-Tyr759 de TLR3. Le TLR3 induit également l'apoptose par des mécanismes TRIF et RIP-dépendants. En effet, l'interaction de TRIF avec RIP1 permet de recruter l'adaptateur FADD par son domaine homotypique DD. FADD interagit lui-même avec la procaspase-8 qui initie alors la mort cellulaire. Figure tirée de (Vercammen et al., 2008).

L'activation du TLR3 permet aussi d'activer les voies de signalisation menant à la mort cellulaire. La mort cellulaire induite par TRIF requiert l'activité caspase initiée par l'axe FADD/caspase 8. Cette fonction pro-apoptotique est reliée au motif RHIM en C-terminal de TRIF, qui interagit avec RIP1. Ainsi, la détection d'ARN viral par TLR3 a le potentiel de déclencher l'apoptose par l'axe TRIF/RIP1/FADD/caspase 8-dépendant, ce qui représente un mécanisme de défense important visant à limiter l'étendue de l'infection (**Fig. 11**) (Han et al., 2004; Kaiser et Offermann, 2005; Ruckdeschel et al., 2004).

### 1.3.4 Les récepteurs intracellulaires de la famille des RLHs

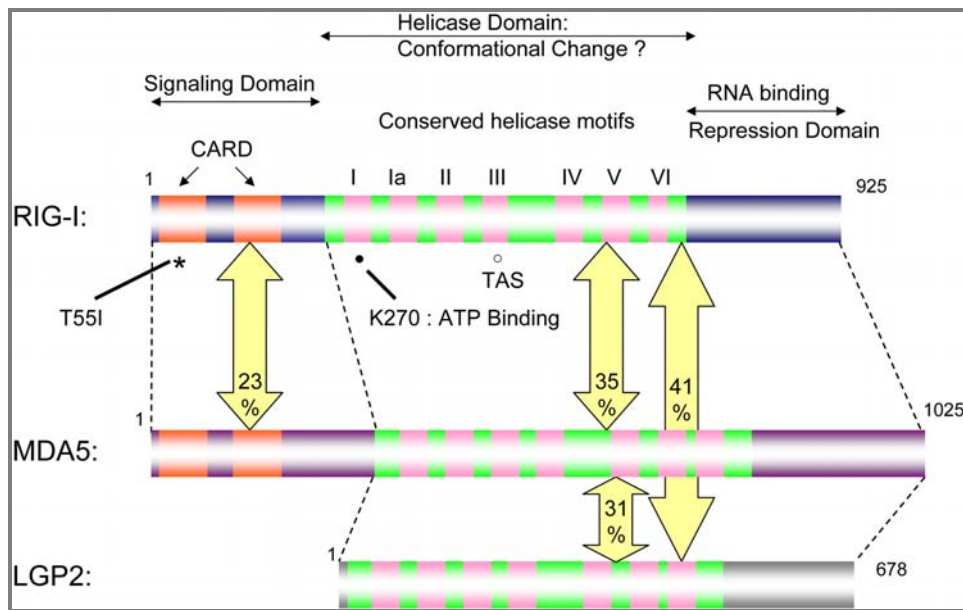
#### 1.3.4.1 Présentation et caractéristiques structurales

Le répertoire des récepteurs du système immunitaire inné est spécialisé dans la détection d'un large éventail d'infections virales et l'activation d'une réponse antivirale adéquate. La détection des virus par l'organisme est essentiellement basée sur la reconnaissance des acides nucléiques viraux. Plusieurs membres de la famille des récepteurs de type Toll sont capable de détecter l'ARN viral soit en surface de la cellule ou dans les endosomes, localisations permettant d'éliminer en condition physiologique une détection de l'ARN du Soi. Par contre, la reconnaissance des ARNs viraux cytosoliques ne suit pas les mêmes règles, puisque la localisation d'ARN du Soi y est fréquente. Les longues molécules d'ARNdb sont pourtant considérées comme des PAMPs d'origine virale susceptibles d'activer plusieurs familles de récepteurs à ARN comme les RLHs, PKR ou encore OAS. En effet, certains motifs comme par exemple des extrémités tri-phosphate en 5' de la séquence d'ARN sont des éléments-clé utilisés par l'immunité innée afin de distinguer le Soi du non-Soi (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006; Plumet et al., 2007).

Un motif tri-phosphate est initialement présent au niveau de l'extrémité 5' de toute molécule d'ARN viral ou du Soi, ces dernières étant générées par des polymérases à ARN. Cependant, chez les eucaryotes, suite à une synthèse, les molécules d'ARN sont transformées par clivage, coiffage et modifications de bases au niveau du nucléole avant leur relâchement dans le cytoplasme. Les ARNs du Soi ne sont alors pas reconnus par les RLHs, contrairement aux ARNs viraux générés par les polymérases virales. Certains mécanismes d'interférence virale reposent d'ailleurs sur la dissimulation ou l'élimination de motifs comme les extrémités 5'PPP, évitant ainsi leur détection par la cellule hôte (Habjan et al., 2008).

Les RLHs font partie d'une large superfamille d'hélicases dont les fonctions sont variées, comme le déroulement de duplexes d'acides nucléiques, la motricité ou la translocation de molécules, le remodelage d'acides nucléiques et de complexes d'acides nucléique/protéine. Dans cette famille, on retrouve trois hélicases à ARN cytoplasmique, incluant RIG-I (Yoneyama et al., 2004), MDA5 (Gitlin et al., 2006; Kang et al., 2002; Kato et al., 2006; Yoneyama et al., 2004), et LGP2 (Andrejeva et al., 2004; Gitlin et al., 2006; Kang et al., 2002; Kato et al., 2006; Rothenfusser et al., 2005; Yoneyama et al., 2005; Yoneyama et al., 2004). RIG-I et MDA5 possèdent deux domaines fonctionnels permettant l'activation de la voie de signalisation (**Fig. 12**). Tout d'abord on retrouve une répétition de deux domaines CARD, domaine également présent au niveau de leur adaptateur commun appelé CARDIF. Les deux RLHs possèdent également un domaine hélicase à

motif « DEAD box » conservé. Par contre, l'hélicase LGP2 ne contient pas de domaine CARD, mais uniquement le domaine hélicase (Andrejeva et al., 2004; Yoneyama et al., 2005). Les RLHs sont aussi caractérisées par un domaine C-terminal conservé appelé CTD, responsable de la spécificité d'attachement aux ARNs viraux, incluant les ARNdb et les ARNsb à extrémité 5'PPP. Le domaine C-terminal a également une fonction de régulation négative (**Fig. 12**). Cependant, si la structure primaire de la région en C-terminal est conservée parmi les trois hélicases, la fonction de répression n'a été observée que pour RIG-I et LGP2 (Saito et al., 2007). En effet, on a démontré que RIG-I dont le domaine CARD a été délété agit comme dominant négatif sur la voie de signalisation, tout comme LGP2 qu'on croit être un régulateur négatif naturel des voies de signalisation induites par des virus (Komuro et Horvath, 2006; Rothenfusser et al., 2005; Yoneyama et al., 2005).

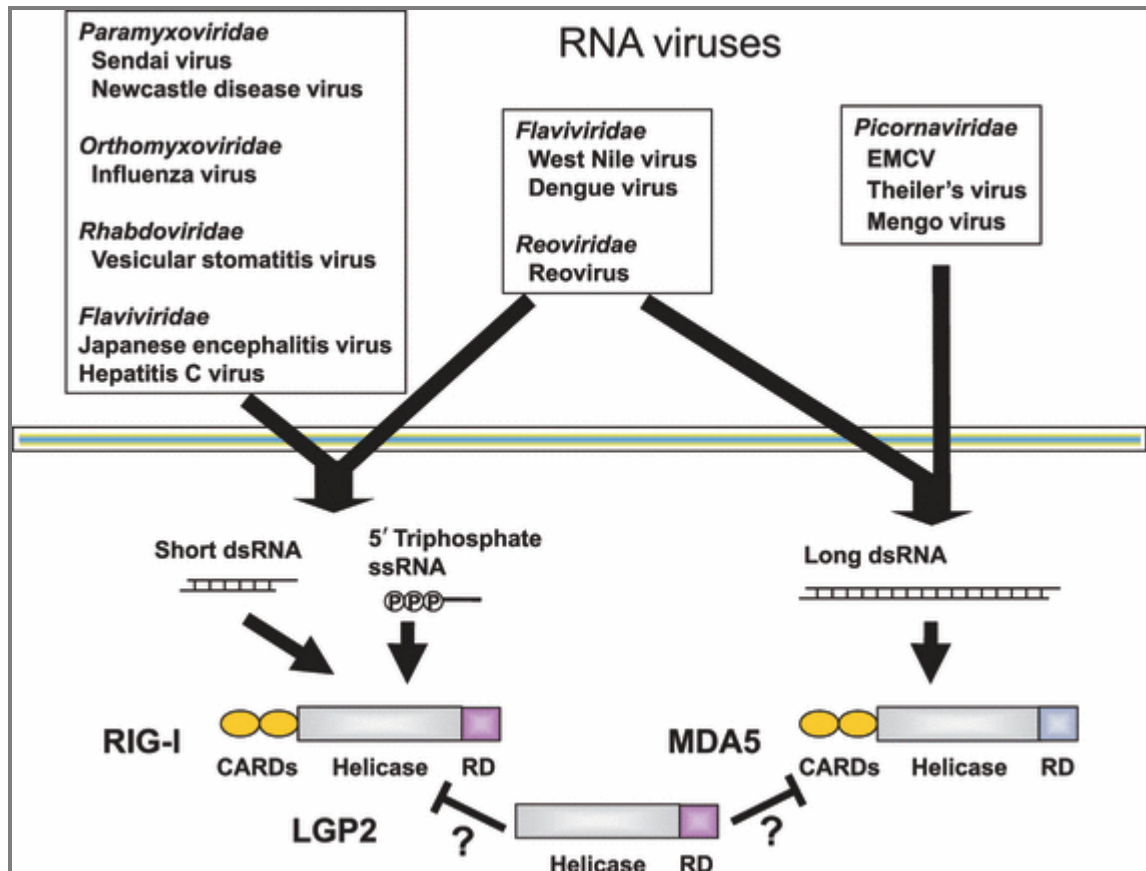


**Figure 12:** Domaines et motifs retrouvés chez les récepteurs d'ARN cytosolique de la famille des RLHs

RIG-I est composée d'un domaine de signalisation CARD, d'un domaine hélicase et d'un domaine à la fois de reconnaissance de l'ARN et de répression de la voie de signalisation. La mutation T551 est une substitution qui inactive le domaine CARD (Sumpter et al., 2005) et que l'on retrouve dans la lignée hépatocytaire Huh7.5, qui est ainsi plus permissive à l'infection avec le Virus de l'Hépatite C. Le K270 est le motif d'attachement de l'ATP et le TAS est un motif de trois acides aminés impliqués dans la fonction hélicase (Pause et Sonenberg, 1992). L'identité entre les différentes séquences en acides aminés est indiquée en %. À la différence de RIG-I et MDA5, LGP2 ne contient pas de domaine CARD, ce qui empêche la signalisation. Figure tirée de (Yoneyama et al., 2008).

Les RLHs se caractérisent par leur spécificité de reconnaissance pour certains virus (**Fig. 13**). Ainsi, RIG-I est activée par les Flavivirus, les Paramyxovirus, les Rhabdovirus et les

Orthomyxovirus (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006), alors que MDA5 est principalement activée par les Picornavirus (Kato et al., 2006; Loo et al., 2008).



**Figure 13:** Spécificité de reconnaissance des virus à ARN par les hélicases de la famille des RLHs

RIG-I reconnaît les ARNs à extrémité 5'PPP ainsi que les ARNs courts générés au cours d'infection avec les Paramyxoviridae, les Orthomyxoviridae, les Rhabdoviridae ou encore les Flaviviridae, alors que MDA5 peut discriminer les ARNs longs provenant d'une infection avec des Picornaviridae. LGP2 a un rôle de régulation encore peu caractérisé. Figure tirée de (Takeuchi et Akira, 2009).

### 1.3.4.2 RIG-I: activation et spécificité de ligand

#### 1.3.4.2.1 Mécanisme d'activation

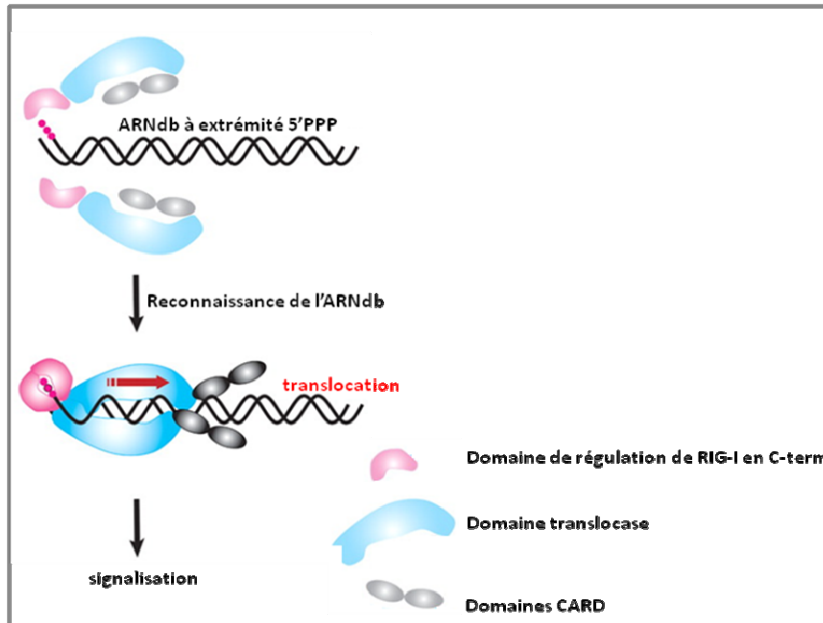
Cui et al. ont démontré que le domaine régulateur en C-terminal de RIG-I avait un double rôle : il est à la fois impliqué lors de la détection du ligand, mais aussi lors du changement de structure menant à la dimérisation de RIG-I (Cui et al., 2008). En effet, le domaine CTD joue un rôle critique dans la spécificité de reconnaissance de l'ARNdb et de l'ARN à extrémité 5' PPP, alors que l'hélicase coopère en augmentant l'affinité pour l'ARNdb grâce à un changement conformationnel. Les domaines CARDs en tandem sont essentiels quant à eux pour la transduction



du signal via une interaction CARD-CARD avec le domaine CARD de l'adaptateur en aval appelé IPS-1/MAVS/VISA/CARDIF (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Wang et Chao, 2005). En fait, une étroite coopération entre les trois domaines de RIG-I est nécessaire au cours de la reconnaissance du ligand et lors de la transduction du signal (Takahasi et al., 2008).

À l'état non activé, il semblerait que RIG-I soit dans une conformation fermée via une interaction entre ses trois domaines (Saito et al., 2007). Suite à l'infection virale, le CTD reconnaît l'ARN viral et induit un réarrangement permettant à RIG-I de dimériser et de former un complexe stable avec l'ARN (**Fig. 14**). RIG-I se retrouve alors en conformation ouverte et ses domaines CARDS en tandem se retrouvent exposés ce qui permet une interaction avec CARDIF, son adaptateur en aval (Takahasi et al., 2008; Yoneyama et Fujita, 2008; Yoneyama et al., 2008). Notons que les fonctions de répression et de reconnaissance de l'ARN au niveau du CTD sont strictement indépendantes puisqu'un mutant de LGP2 qui ne reconnaît pas l'ARN est encore capable d'interférer avec la voie de signalisation médiée par RIG-I (Bamming et Horvath, 2009; Li et al., 2009a).

Des expériences de résonance magnétique nucléaire (Takahasi et al., 2008) et de cristallographie (Cui et al., 2008) ont permis de révéler la présence d'un sillon chargé positivement au niveau du CTD qui pourrait être la zone d'attachement de l'ARN. Des différences dans la séquence d'acides aminés au niveau du sillon pourraient d'ailleurs expliquer les différences de spécificité et d'affinité entre les différentes RLHs. Cela dit, des données contradictoires ne permettent pas encore de clairement définir les mécanismes exacts de liaison du ligand à RIG-I versus à LGP2 par exemple, puisque des éléments structuraux secondaires sembleraient également jouer un rôle important (Takahasi et al., 2009).



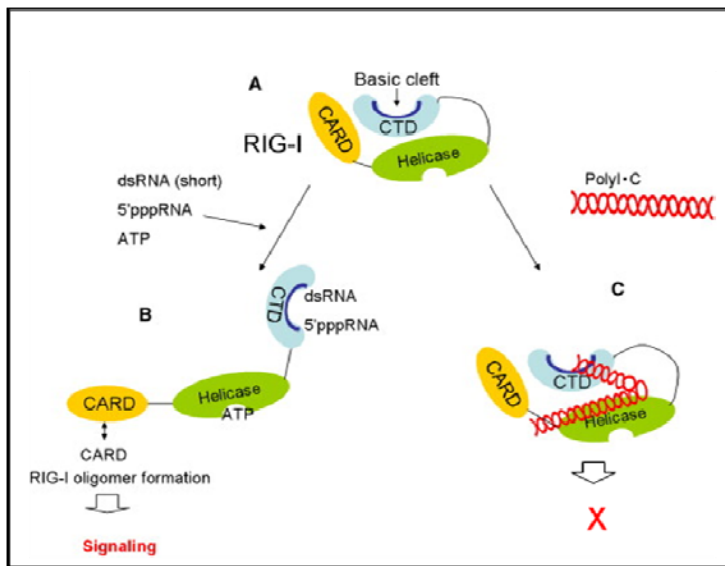
**Figure 14:** Mécanisme d'activation de RIG-I

L'attachement du domaine de régulation de RIG-I (en rose) à l'extrémité 5' tri-phosphate de l'ARN (produit de réplication virale, de transcription ou structure secondaire de l'ARN) induit la dimérisation de RIG-I et active son domaine translocase (en bleu). La reconnaissance d'ARNdb stimule l'activité ATPase, ce qui induit une translocation (flèche rouge). Cette translocation réoriente les domaines CARDS qui adoptent une conformation propice à l'activation de la voie de signalisation. Figure adaptée de (Myong et al., 2009).

#### 1.3.4.2.2 Ligands

Alors qu'initialement ce sont de longues molécules d'ARNdb que l'on pensait être les ligands de RIG-I, plusieurs études ont démontré l'importance du groupement tri-phosphate en extrémité 5' de l'ARN (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). Le rôle potentiel de la séquence de l'ARN détecté par RIG-I a été approfondi par Saito et al., qui ont déterminé que l'activation de RIG-I par l'ARN du VHC reposait à la fois sur la présence de séquences riches en U ou en A en 3' et sur une extrémité tri-phosphate en 5', ces deux éléments pouvant être séparés par plusieurs centaines de paires de bases comme c'est le cas dans le génome du VHC, puisque seule une extrémité 5' triphosphate n'est pas suffisante pour l'activation de RIG-I (Saito et al., 2008). Une étude récente a également démontré l'importance de la séquence de la molécule d'ARN pour sa reconnaissance par RIG-I. En effet, l'introduction de guanosines à l'extrémité 5'-terminale d'un ARN en tige-boucle transcrit *in vitro* diminue significativement son potentiel à induire des IFNs de type I (Gondai et al., 2008). Par ailleurs, une courte structure d'ARNdb (5 à 10 paires de bases), ainsi qu'une extrémité 5' tri-phosphate sont suffisants pour l'activation de RIG-I (Schmidt et al., 2009).

Lorsque le substrat de RIG-I ne contient pas d'extrémité 3', RIG-I va transloquer le long de l'ARNdb sans dérouler les brins. La vitesse de translocation est augmentée par la présence d'un groupe 5'PPP. Par contre, en présence d'une extrémité 3', RIG-I peut dérouler les brins, ce qui mène à une dissociation de RIG-I des brins séparés. En fait, de bons substrats pour la fonction hélicase de RIG-I n'induiront pas un signal d'activation de la voie de signalisation. Par contre, des extrémités 5'PPP permettent la formation d'un complexe stable entre le ligand et RIG-I, ce qui induit la voie de signalisation. Par ailleurs, une molécule comme le poly(I:C) n'entraînera pas l'activation de la voie de signalisation par RIG-I, mais plutôt la formation d'un complexe stable inactif (**Fig. 15**) (Myong et al., 2009; Takahasi et al., 2008).



**Figure 15** : Reconnaissance des ARNdb courts et des ARNsb à extrémité 5'PPP et activation de RIG-I

RIG-I est normalement en configuration fermée dans laquelle le domaine hélicase, les domaines CARD et le CTD interagissent et répriment l'activation de la voie de signalisation (A). Suite à la reconnaissance d'ARNdb courts ou d'ARNsb à extrémité 5'PPP, RIG-I est activée et change de conformation de façon à activer la voie de signalisation (B). Par contre, des ARNdb comme le poly(I:C) entraînent la formation d'un complexe stable avec RIG-I qui n'aboutit pas à l'activation de la voie de signalisation. Figure adaptée de (Takahasi et al., 2008).

#### 1.3.4.3 MDA5 : spécificité de ligand

Certains virus produisant de grosses quantités d'ARNdb au cours de leur cycle viral comme les Picornavirus (EMCV, virus de la Polio, Rhinovirus, Theiler, Mengo et Foot-and-Mouth) sont détectés par MDA5 (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006; Schlee et al., 2009). Le virus de la Dengue et les Réovirus sont reconnus à la fois par RIG-I et par MDA5 (Loo et al., 2008; Saito et al., 2007). Le poly(I:C) est un substitut d'ARNdb synthétique de taille relativement longue, variant entre 4 et 8 kb lorsque non clivé et ne contenant pas de motif tri-phosphate en 5'. Lorsque présent dans le

milieu extracellulaire, sa détection par TLR3 est relativement bien caractérisée (Alexopoulou et al., 2001; Choe et al., 2005; Kariko et al., 2004; Matsumoto et Seya, 2008; Schulz et al., 2005). Plus récemment, il a été démontré que MDA5 pouvait détecter de longues molécules d'ARNdb ou encore des molécules comme le poly(I:C) (Saito et al., 2008). Étant l'équivalent d'un long ARNdb, ce dernier n'est pas reconnu par RIG-I; pourtant, des longues molécules d'ARN transcrites *in vitro* (50-1000 pb) sont reconnues par RIG-I, et non par MDA5. On a suggéré que MDA5 reconnaîtrait des molécules d'ARNdb plus longues que 1000 pb, alors que RIG-I détecterait des ARNdb d'une longueur de 300-1000 pb. Par contre, il a été démontré que le poly(I:C) pouvait être converti en un ligand pour RIG-I par clivage (Kato et al., 2008).

#### 1.3.4.4 RIG-I et MDA5 : Voie de signalisation

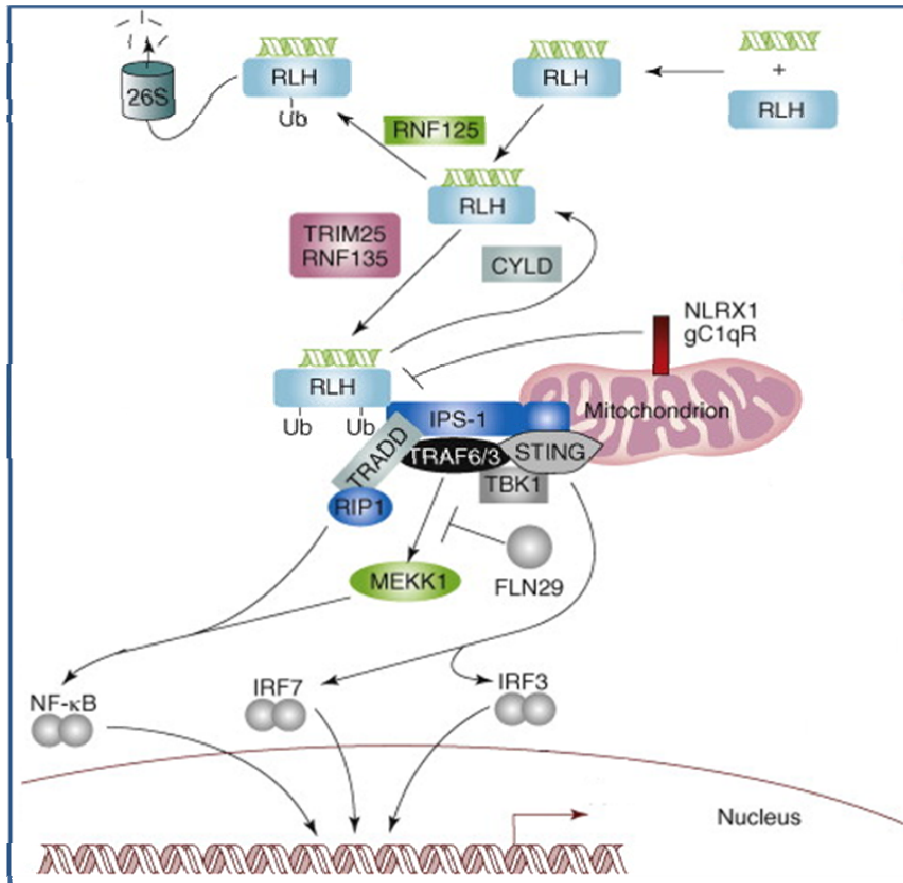
La reconnaissance du ligand par RIG-I ou MDA5 permet le recrutement de leur adaptateur-clé nommé à la fois par différentes équipes, MAVS/IPS1/CARDIF/VISA, qui contient (1) en N-terminal, un domaine CARD interagissant avec les domaines CARD de RIG-I et de MDA5; (2) en C-terminal, un domaine transmembranaire permettant l'ancrage de l'adaptateur à la membrane mitochondriale (**Fig. 16**) (Kawai et al., 2005; Kumar et al., 2006; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Sun et al., 2006).

Une fois le ligand reconnu par RIG-I, il y a ubiquitination des deux domaines CARDS par TRIM25, puis changement de conformation et oligomérisation de RIG-I (Gack et al., 2007; Saito et al., 2007). Les oligomères interagissent par la suite avec CARDIF via leurs domaines CARD respectifs, ce qui permet également de déloger NLRX1 et d'induire l'oligomérisation des dimères de CARDIF. NLRX1 est en effet un membre de la famille des NLRs qui empêche les interactions entre les RLRs et CARDIF et qui diminue l'activation de NFκB et d'IRF3 (Moore et al., 2008).

Les dimères de CARDIF oligomérisés forment une plateforme au niveau de laquelle plusieurs molécules de signalisation convergent et interagissent via la présence de motifs spécifiques de type TRAF retrouvés au niveau de CARDIF (Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). Le recrutement de TRAF3 permettra l'activation de TBK-1 et IKKε, conduisant ainsi à la phosphorylation d'IRF3 et IRF7 (Oganesyan et al., 2006; Saha et al., 2006; Xu et al., 2005). D'un autre côté, le recrutement de TRAF6 et de TRAF2 mènera à l'activation de NFκB.

Les modifications post-traductionnelles, comme l'ubiquitination ou la phosphorylation sont particulièrement importantes au cours de l'activation de ces cascades de signalisation. Ainsi, TRAF6 facilite la poly-ubiquitination en K63 de NEMO, et TRAF2 celle de RIP1. Ces modifications entraînent l'interaction entre RIP1 et NEMO, puis l'activation du complexe IKK.

Cette activation aboutira à la phosphorylation de I $\kappa$ B et au relâchement de p65/p50 (Arimoto et al., 2007; Bibeau-Poirier et al., 2006; Gack et al., 2007; Pawlotsky et al., 2007; Sebban-Benin et al., 2007). Notons que pour être complètement actives, les IKKs doivent être associées avec des protéines d'échafaudage (scaffold), assemblées dans des complexes en présence de protéines régulatrices. Ainsi, il est clairement établi que les complexes formés par RIP1 et sa protéine d'attachement TRADD, tout comme TRAF6 et MEKK1, sont aussi essentiels pour la signalisation (Michallet et al., 2008; Yoshida et al., 2008). Plus récemment, STING (MITA ou MPYS), une autre protéine d'échafaudage, a été découverte pour son rôle majeur dans la formation du complexe d'activation de la voie RIG-I en amont de NF $\kappa$ B et d'IRF3 (**Fig. 16**) (Ishikawa et Barber, 2008; Jin et al., 2008; Zhong et al., 2008). En effet, STING est une protéine transmembranaire qui est requise pour la production d'IFNs de type I suite à une infection virale et qui est située en aval de RIG-I et de CARDIF, mais en amont de TBK-1.



**Figure 16:** Voie de signalisation médiée par les RLRs

La reconnaissance et l'attachement d'un acide nucléique à RIG-I ou à MDA5 engendre la formation d'un complexe multiprotéique aboutissant à l'activation de facteurs de transcription-clé. La fonctionnalité de RIG-I est modulée par une série d'événements d'ubiquitination: l'addition de molécules d'ubiquitines aboutit à sa dégradation par le protéasome si elle est médiée par l'inhibiteur RNF125, alors qu'elle favorisera son interaction avec CARDIF si elle est médiée par TRIM25 ou RNF135. L'attachement de CARDIF à RIG-I peut-être inhibé pour sa part par une désubiquitination médiée par CYLD ou par les protéines mitochondriales NLRX1 ou gC1qR. Figure tirée de (Ranjan et al., 2009).

Le nombre important de composantes impliquées dans la transmission du signal à partir de l'ARN viral cytoplasmique jusqu'à l'activation de NFκB et IRF3 permet d'établir de nombreux points de contrôle dans la voie de signalisation. L'ubiquitination représente par exemple un point de contrôle crucial (**Fig. 16**). Ainsi, TRIM25 favorise l'activation du promoteur de l'IFNβ par ubiquitination de RIG-I en Lys63 (Gack et al., 2008; Gack et al., 2007). Plus récemment, on a démontré que l'ubiquitination en Lys63 dans la région C-terminale de RIG-I par RNF135 favorisait aussi l'activation de la voie de signalisation (Oshiumi et al., 2009). À l'inverse, par son activité de désubiquitination sur RIG-I et CARDIF, CYLD inhiberait la voie (Friedman et al., 2008; Zhang et al., 2008b). La protéine NLRX1 résiderait quant à elle au niveau de la membrane mitochondriale et

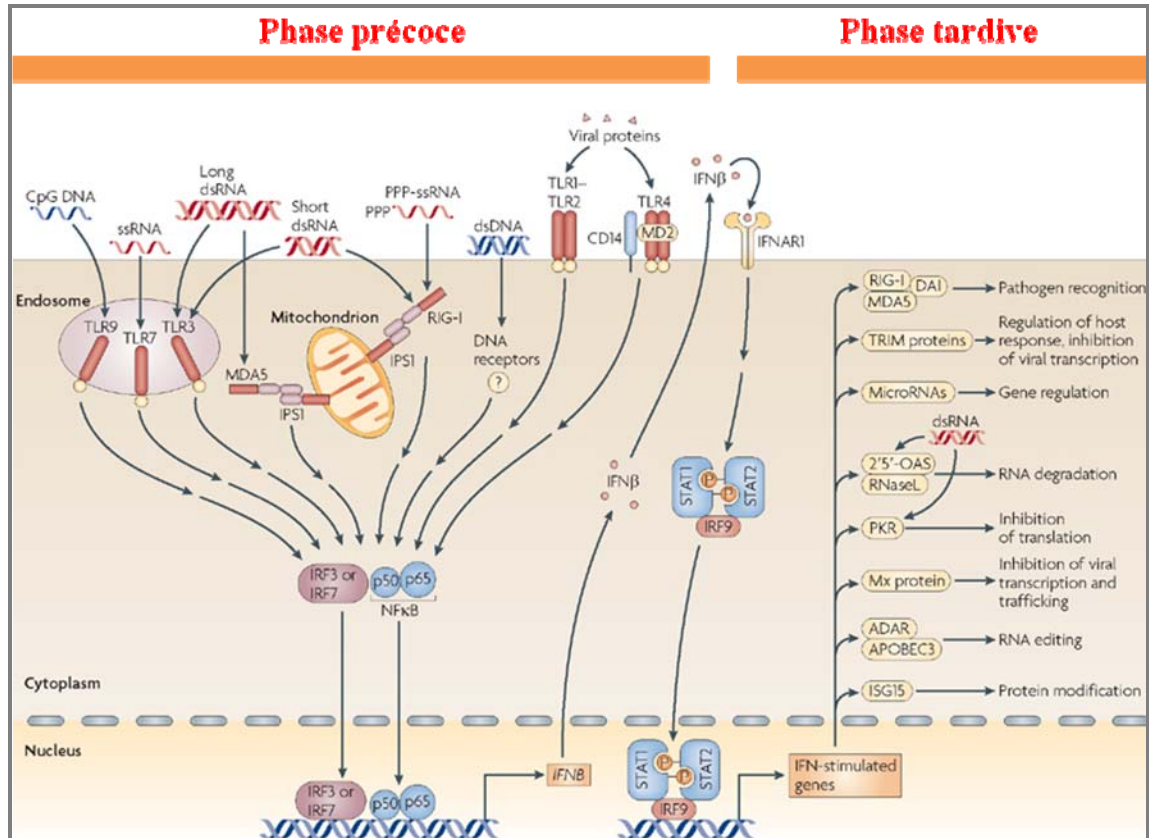
s'associerait de façon constitutive avec CARDIF, empêchant son engagement avec une RLH (Moore et al., 2008).

### 1.3.5 PKR

Une des premières protéines découvertes pour son rôle dans la détection des ARNs intracellulaires fut la kinase à sérine/thréonine PKR (Williams, 2001). Des études ont en effet démontré que des cellules dépourvues de PKR fonctionnelle produisaient beaucoup moins d'IFN $\alpha$  et  $\beta$  suite à un traitement avec du poly(I:C) (Der et Lau, 1995; Diebold et al., 2003; Yang et al., 1995). Par contre, l'absence de PKR dans le cas d'une infection avec le NDV n'a aucun effet sur la synthèse des IFNs (Honda et al., 2003).

PKR est auto-activé suite à son autophosphorylation en présence d'ARNdb viral de façon similaire aux autres protéines d'attachement à l'ARN comme les ADARs, Dicer ou la Ribonucléase III (Tian et al., 2004). La reconnaissance de l'ARNdb par PKR se fait de façon indépendante à sa séquence (Bevilacqua et al., 1996), mais nécessite un ARN de plus de 30 pb (Caplen et al., 2001; Elbashir et al., 2001; Manche et al., 1992). Il a été démontré qu'un ARNsb avec une extrémité 5'PPP portant de courtes structures en tige-boucle pouvait également activer PKR. Dans ce cas, l'activation de PKR et l'initiation d'une réponse antivirale se font de façon indépendante à RIG-I. La reconnaissance d'ARN cytoplasmique par PKR engendre la phosphorylation du facteur de traduction eIF2 $\alpha$ , son substrat le plus connu, ce qui inhibe la traduction des protéines virales et cellulaires (Nallagatla et al., 2007).

La **Fig. 17** résume les différentes étapes de la reconnaissance d'un pathogène viral par la cellule hôte. On distingue une phase dite précoce, ne nécessitant aucune synthèse protéique, puisque tous les acteurs de cette phase sont exprimés de façon constitutive. Cette phase mène, entre autre, à la synthèse d'IFNs de type I. Ces derniers entraînent l'initiation d'une phase dite tardive, au cours de laquelle la voie classique des IFNs est engagée. Cette phase, qui nécessite une synthèse protéique, mène à l'expression d'IRF7, de TLR3, RIG-I et PKR ainsi que de nombreux gènes à fonction antivirale, ce qui engendre une boucle d'amplification positive. La synthèse de régulateurs spécifiques de ces voies permettra également de moduler cette réponse.



**Figure 17:** Bilan des voies de détection des pathogènes viraux et activation de la réponse interféron classique

La détection de différents motifs viraux par des récepteurs hautement spécialisés (les PRRs) de l'hôte aboutit à l'activation des facteurs de transcription-clé : IRF3, IRF7 et NFκB, permettant ainsi la synthèse d'IFN de type I, dont l'IFNβ qui initie à son tour l'activation de la voie classique des IFNs. Des gènes antiviraux-clé ciblant différentes étapes du cycle viral (*OASL*, *RNASE L*, *ADAR*...) sont ainsi induits, tout comme les gènes codant pour les PRRs ou leurs adaptateurs comme RIG-I, MDA5 et TRIM permettant ainsi une puissante amplification de la réponse à partir du signal initial. Figure adaptée de (Bowie et Unterholzner, 2008).

### 1.3.6 Les régulateurs négatifs des voies de signalisation

Bien que des réponses pro-inflammatoires et antivirales puissantes puissent être bénéfiques pour éradiquer un pathogène, une activation prolongée ou exagérée des voies de signalisation peut entraîner des effets délétères. Par exemple, une activation excessive de la voie de signalisation des TLRs contribue à la pathogenèse de maladies inflammatoires chroniques (Cook et al., 2004). Il existe donc des mécanismes de régulation négative permettant de maintenir un certain équilibre.

#### 1.3.6.1 Ubiquitination et désubiquitination

L'ubiquitination est un mécanisme qui dirige les protéines au protéasome 26S pour dégradation. Plusieurs membres de la famille des ligases de type E3-ubiquitine comme A20,



RNF125, Pin1, RBCK1, RNF5 et Ro52, ciblent des composants-clé de la voie de signalisation antivirale et les dirigent au protéasome (Higgs et al., 2008; Komuro et al., 2008; Takeuchi et Akira, 2009; Zhang et al., 2008a; Zhong et al., 2009).

La protéine A20 est une enzyme à double-fonction: tout d'abord, elle agit en tant qu'enzyme de désubiquitination, en enlevant la chaîne polyubiquitinylée en K-63 de la protéine RIP1. A20 peut également avoir une fonction E3 ligase, permettant la polyubiquitination de RIP1 en K48 et l'orientant ainsi vers la dégradation (Sun, 2008). Des BMDMs déficients en A20 produiront plus de TNF $\alpha$ , d'IL6 et de NO suite à une stimulation avec du LPS. Des données *in vivo* nous indiquent également que la protéine A20 protège les souris d'un choc toxique grâce à une régulation de la réponse immunitaire suite à un traitement avec du LPS, et ce par désubiquitination en K63 de TRAF6, permettant de bloquer l'activation de NF $\kappa$ B suite à une activation des TLRs (Boone et al., 2004).

L'enzyme de désubiquitination DUBA est également impliquée dans la régulation négative des voies de signalisation. L'emploi d'un ARN d'interférence (siRNA) contre DUBA aboutit à l'augmentation de la production d'IFN de type I suite à l'activation du TLR3. En fait, il a été démontré que DUBA pouvait interagir directement avec TRAF3 et inhiber son auto-ubiquitination. TRAF3 est lui-même une ligase de type E3-ubiquitine destinée préférentiellement à ajouter des molécules d'ubiquitine en K63, élément essentiel à la production d'IFN de type I. DUBA, par son activité de désubiquitination sur TRAF3, engendre un arrêt de la cascade de signalisation vers TBK-1 et IKK $\epsilon$  (Kayagaki et al., 2007).

### 1.3.6.2 Autres exemples de régulateurs négatifs

La protéine SARM est un régulateur négatif de la voie dépendante de TRIF; en effet, l'expression de SARM bloque l'induction des gènes en aval de TRIF et non de MyD88, alors qu'une inhibition de son expression mène à une augmentation de l'induction des gènes codant pour les cytokines et chemokines. Il y aurait une interaction directe en TRIF et SARM, lequel contient un domaine TIR et qui affecterait la voie de signalisation en rendant TRIF moins accessible (Carty et al., 2006).

La kinase RIP3 inhibe l'activation de NF $\kappa$ B en compétitionnant avec RIP1 au niveau de TRIF (Meylan et al., 2004). D'autres régulateurs endogènes négatifs interagissant avec TRIF ont également été décrits, comme PIASy, TRAF1 et TRAF4 (Vercammen et al., 2008). Ces protéines inhibent à la fois l'activation d'IRF3 et de NF $\kappa$ B. La protéine SIKE, quant à elle, interfère

uniquement avec l'activation d'IRF3 lors de la stimulation de TLR3, en empêchant les interactions entre TRIF et TBK-1/IKK $\epsilon$ , sans toutefois viser les interactions entre TRIF et TRAF6/RIP1 (Huang et al., 2005).

Plus récemment, il a été démontré qu'ISG56, connu pour ses fonctions d'inhibition de l'initiation de la traduction suite à une interaction avec eIF3, avait également le potentiel de réguler négativement les réponses antivirales cellulaires, et ce par association avec l'adaptateur MITA, empêchant l'interaction entre ce dernier et CARDIF ou TBK-1, ce qui aboutit à l'inhibition de l'activation d'IRF3 (Li et al., 2009c). Ainsi, suite à une forte induction d'ISG56 au cours d'une infection virale, ce dernier pourrait réguler négativement l'induction des IFN $\beta$  et la formation du complexe VISA/MITA/TBK-1.

L'épissage alternatif est un autre mécanisme qui permet de produire à partir d'un même gène, plusieurs ARN messagers, pouvant parfois coder pour des protéines dont les fonctions seront antagonistes. Certains variants d'épissage se retrouvent dans les régulateurs négatifs des voies de signalisation médiées par TLR3. Le variant MyD88s, dont il manque le domaine intermédiaire, a déjà été décrit comme un inhibiteur dominant négatif, sa surexpression inhibant significativement l'activation de NF $\kappa$ B suite à une stimulation avec des LPS. En effet, si en présence de MyD88s le recrutement d'IRAK1 est encore possible, sa phosphorylation est par contre bloquée (Janssens et al., 2002).

## 2. Le Virus de l'Hépatite C

Le virus de l'Hépatite C (VHC) a été identifié par Choo et son équipe en 1989, suite au criblage de plusieurs centaines de millions de clones, les techniques habituellement utilisées pour la purification de virus n'ayant pas fonctionné pour ce virus appelé à l'époque le virus de l'hépatite non-A non-B (Choo et al., 1989). Le VHC est une cause majeure de maladies avancées du foie et reste la principale indication pour les transplantations hépatiques en Amérique du Nord (Hoofnagle, 2002; Sharma et Lok, 2006). La morbidité et la mortalité associées au VHC sont attribuables au développement d'une hépatite chronique qui résulte en une fibrose progressive puis une cirrhose avec un risque accru d'hépatocarcinome (Freeman et al., 2001b). Ce virus affecte 3% de la population mondiale et résulte en une maladie chronique dans 40 à 50% des cas (Shepard et al., 2005). La prévalence de la maladie varie considérablement selon la localisation géographique (2% en Amérique du Nord, 3-4% dans certains pays méditerranéens et asiatiques et jusqu'à plus de 10% dans certaines régions d'Afrique Centrale et en Égypte) et à l'intérieur même des populations (en Angleterre et au Pays de Galles, 0.6% de la population adulte âgée de 15 à 59 ans ont des anticorps contre le VHC) (Thomson, 2009; Wasley et Alter, 2000). Selon les estimations récentes, en décembre 2007, 242 500 Canadiens étaient infectés par le VHC, ce qui correspond à une prévalence de 0.7% (Agence de santé publique du Canada<sup>1</sup>). L'Hépatite C est donc un problème majeur de santé publique puisqu'il a d'ailleurs été estimé que d'ici 2030, le VHC causera une morbidité et une mortalité dans les pays industrialisés supérieures à celles liées au VIH. En effet, si l'incidence du VHC diminue dans certains pays, le nombre de personnes souffrant des conséquences de la chronicité de la maladie augmentent (Deuffic-Burban et al., 2007; Sweeting et al., 2007).

### 2.1 Les grandes lignes de l'infection avec le VHC

#### 2.1.1 Données épidémiologiques

La transmission du virus étant principalement parentérale, les utilisateurs de drogues injectables constituent le groupe d'individus le plus à risque dans les pays industrialisés, et ce dû à la réutilisation ou bien au partage des seringues (Shepard et al., 2005).

Au Canada, l'injection de drogues est associée à 70 à 80% des nouveaux cas d'infection (Agence de santé publique du Canada<sup>1</sup>). Dans les grandes villes canadiennes, les voyages dans une région où le

---

<sup>1</sup> <http://www.phac-aspc.gc.ca/sti-its-surv-epi/hcv-epi-fra.php>

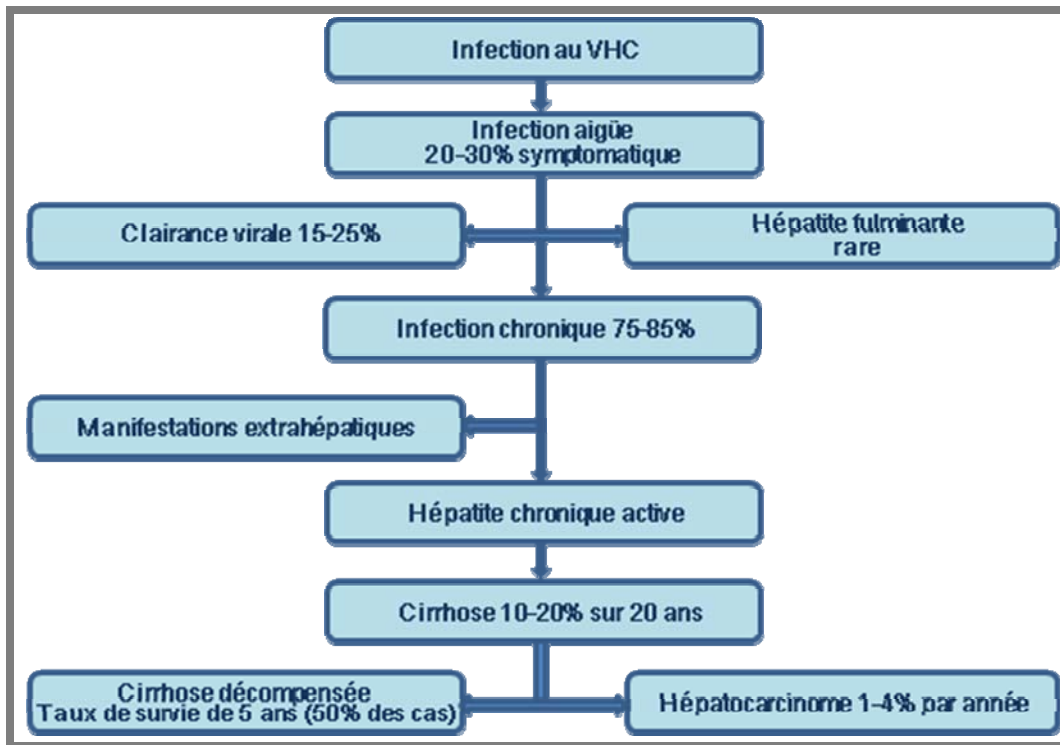
VHC est endémique constituent le deuxième facteur de risque, et ce, à cause du taux plus élevé d'infections avec le VHC acquises en milieu de soin de santé. D'ailleurs, la transmission accidentelle du VHC au cours d'une campagne médicale nationale concernant le traitement parentéral de la schistosomiasis en Égypte a profondément affecté la prévalence du VHC allant jusqu'à 15% dans certaines régions du pays (Frank et al., 2000). Le criblage systématique des banques de sang au Canada depuis 1990 a pratiquement éliminé ce risque d'infections post-transfusionnelles. Un risque élevé est associé au tatouage ou au perçage corporel au moyen de matériel contaminé, au partage d'articles d'hygiène personnelle avec une personne infectée par le VHC et à l'exposition professionnelle à du sang contaminé (Clarke et Kulasegaram, 2006). Le risque de transmission sexuelle est extrêmement faible sinon inexistant (Vandelli et al., 2004). Cependant, un groupe à risque émerge parmi les hommes infectés avec le VIH, chez qui la transmission du VHC se ferait de façon permucosale plutôt que percutanée et corrèlerait avec le nombre de partenaires sexuels, le partage de drogues ainsi que les pratiques sexuelles à risque (Danta et al., 2007). Le risque de transmission mère-enfant est de moins de 5%. Par contre les femmes co-infectées avec le VIH et le VHC sont 2 fois plus à risque de transmettre à leurs enfants le VHC comparément aux femmes infectées avec le VHC seulement (Pembrey et al., 2005; Roberts et Yeung, 2002).

### **2.1.2 Histoire naturelle de la maladie**

La majorité des épisodes primaires d'infection avec le VHC sont asymptomatiques et les signes cliniques associés à une hépatite aigüe sont très similaires à des hépatites d'autres étiologies, c'est-à-dire, nausée, vomissements, perte d'appétit et jaunisse. La phase d'infection aïgue de l'hépatite C se définit par une virémie importante en absence d'anticorps détectables dans le sang. La plupart des patients deviennent séropositifs en 3 mois, cependant la séroconversion peut prendre jusqu'à 6 mois. De façon habituelle, le VHC n'est pas diagnostiqué jusqu'à ce que les niveaux sériques d'ALT indiquant des dommages hépatiques augmentent significativement généralement 8 à 12 semaines suivant le début de l'infection. Parmi les personnes infectées, 54-80% d'entre elles développeront une virémie persistante en dépit de la détection par ELISA d'anticorps spécifiques au VHC ainsi que d'une réponse immunitaire cellulaire VHC-spécifique (Gerlach et al., 2003; Micallef et al., 2006; Wawrzynowicz-Syczewska et al., 2004).

Au fil des années, la nécro-inflammation hépatique progressive entraîne le développement d'une fibrose hépatique, puis d'une cirrhose avec perte des fonctions hépatiques et risque accru d'hépatocarcinome. La vitesse de progression de la maladie varie beaucoup selon les individus

infectés, mais on estime que la progression vers une cirrhose après 20 ans de maladie se fait dans 4 à 22% des cas (**Fig. 18**) (Freeman et al., 2001a).



**Figure 18:** Histoire naturelle de l'infection virale avec le VHC

Suite à l'infection primaire, la majorité des individus développent une infection chronique qui est associée à une nécro-inflammation du foie. L'infection chronique avec le VHC mène à une fibrose progressive et ultimement une cirrhose qui résulte dans certains cas à un hépatocarcinome. Figure adaptée de (Chen et Morgan, 2006).

### 2.1.3 Dynamique de l'infection

L'infection avec le VHC est un processus hautement dynamique puisque la demi-vie du virion ne dépasse pas quelques heures (3 à 5 hrs) et que la production quotidienne de virions chez un individu infecté peut dépasser  $10^{12}$  particules (Neumann et al., 1998; Ramratnam et al., 1999; Zeuzem et al., 1998). Si l'on considère que 10% des hépatocytes sont infectés (Lau et al., 2008), ceci implique que 50 virions sont produits quotidiennement par chaque hépatocyte. Cette cinétique rapide de répllication virale additionnée d'une polymérase dotée d'une faible fidélité de lecture assure une très haute variabilité génomique du virus (Neumann et al., 1998; Ogata et al., 1991; Zeuzem et al., 1998). On dénombre six géotypes majeurs parmi les isolats du VHC, différant chacun d'au moins 30% dans leur séquence (Simmonds, 2004; Simmonds et al., 1993). Les géotypes 1 à 3 se retrouvent partout dans le monde, alors qu'en Inde, en Asie du Sud-Est et au Brésil, le géotype 3 est prédominant. Les géotypes 2 et 5 sont retrouvés principalement sur le

continent africain et le génotype 6 en Asie du Sud-Est. Au Moyen-Orient, le génotype 4 est prépondérant. Les génotypes sont eux-mêmes divisés en un grand nombre de sous-types. De plus, à ces sous-catégories s'ajoutent les nombreuses quasi-espèces retrouvées chez chaque patient, puisqu'au cours de la maladie, le virus évolue constamment pour former une population virale très hétérogène en lien d'ailleurs avec la sélection exercée par la réponse immune de l'hôte (Farci et al., 2000; Weiner et al., 1995) ainsi que par les traitements antiviraux (De Francesco et Migliaccio, 2005).

L'existence de quasi-espèce contribue grandement à la persistance virale. Il a d'ailleurs été démontré que des patients atteints d'hépatite C chronique ont une plus grande complexité génétique en terme de diversité de quasi-espèce que des patients présentant un diagnostic de guérison spontanée (Pawlotsky, 2006a).

## 2.2 Structure génomique et protéines du VHC

### 2.2.1 Le génome du VHC

Le VHC est un petit virus enveloppé à ARN simple brin positif appartenant à la famille des *Flaviviridae* et au genre des *Hepacivirus*. Son génome linéaire qui ne contient ni coiffe, ni queue poly-A, a une longueur d'environ 9600 nucléotides. Il est composé d'un long cadre de lecture flanqué de courtes régions non codantes hautement structurées aux extrémités 5' et 3'. La région non traduite à l'extrémité 5' dite 5'NTR, a une longueur d'environ 340 nucléotides et contient six domaines à structure secondaire appelés SLs (Stem-loops). Les SLII, III et IV forment la séquence d'attachement au ribosome 40S appelée IRES (**Fig. 19**) (Wang et al., 1993). La portion 5'NTR contient également des signaux essentiels pour la synthèse du brin d'ARN négatif qui sert d'intermédiaire de réplication (Friebe et al., 2001).

Un micro-ARN spécifique exprimé dans le foie, miR-122, s'attache à deux sites en tandem juste en aval de SLI (Henke et al., 2008; Jopling et al., 2008; Jopling et al., 2005). L'interaction entre miR-122 et l'extrémité 5'NTR régule la réplication et la traduction du VHC; l'expression ectopique de ce miRNA augmente d'ailleurs la réplication du VHC dans des cellules non-hépatiques (Chang et al., 2008). Bien qu'une étude plus récente n'ait pas observé de corrélation entre les niveaux d'expression du miR-122 et la charge virale *in vivo*, une corrélation inverse entre le niveau de miR-122 chez des patients en prétraitement et leur sensibilité à la thérapie (PEG-IFN $\alpha$ )

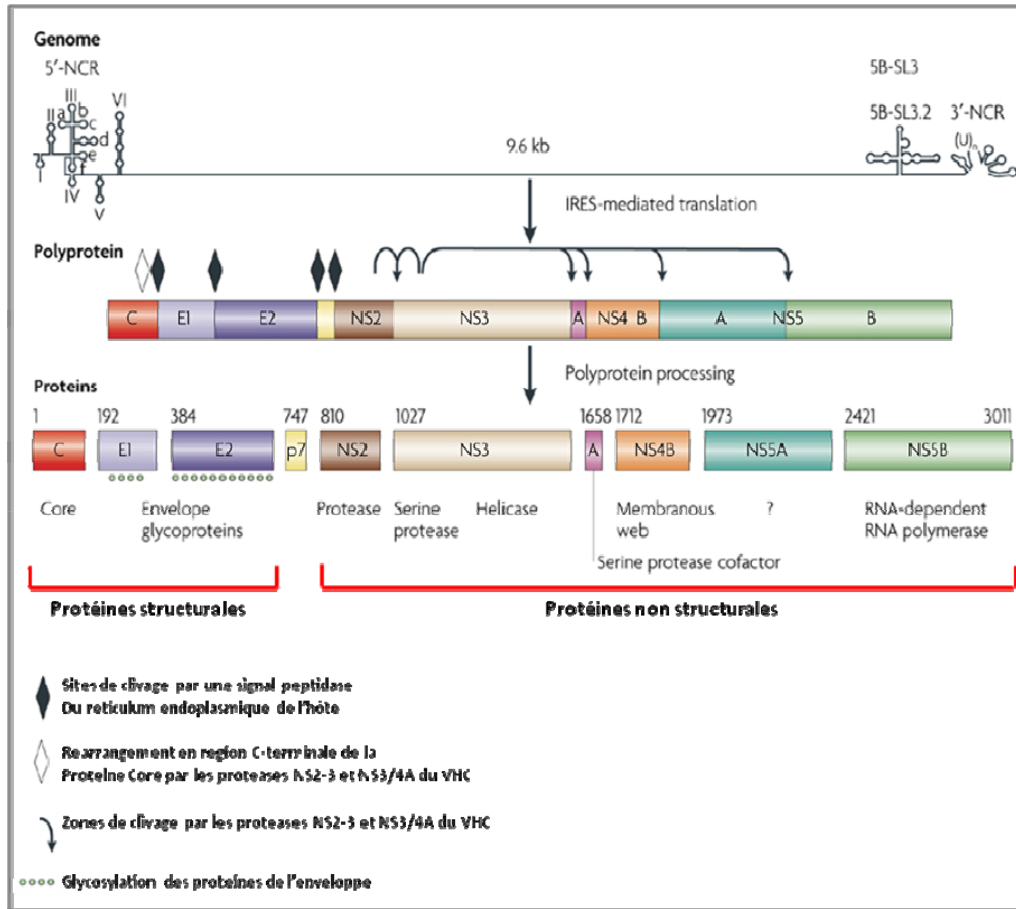
a été démontrée, suggérant même la possibilité d'utiliser ce miRNA comme biomarqueur de probabilité de réussite à une thérapie avec l'IFN pégylé (Sarasin-Filipowicz et al., 2009).

L'extrémité 3' est composée de 3 domaines structuraux : une région variable d'environ 40 nucléotides en aval de la séquence codante, une région de longueur variable riche en séquences poly(U/UC), ainsi qu'une séquence hautement conservée de 98 nucléotides désignée la X-tail. Plusieurs études ont démontré qu'un segment poly(U/UC) d'une longueur minimale de 25 nucléotides ainsi que la présence de la X-tail étaient indispensables à une réplication efficace du virus en culture ainsi qu'à son infectivité *in vivo* (Friebe et Bartenschlager, 2002; Kolykhalov et al., 1996; Yanagi et al., 1999; Yi et Lemon, 2003).

Des CREs (Cis-Acting Regulatory Elements) sont également retrouvés dans la région codante de la polyprotéine. Trois SLs ont en effet été identifiées dans la séquence de la NS5B (Lee et al., 2004a; Lee et al., 2004b; Tuplin et al., 2004; You et al., 2004). L'une d'elles, la 5BSL3.2 entre en contact avec la 3'SLII de la queue X-tail formant une boucle dite « kissing loop », élément critique pour la réplication virale (Friebe et al., 2005).

### 2.2.2 Les protéines structurales du VHC

La polyprotéine du VHC d'une longueur de 3300 acides aminés est clivée de façon co- et post-traductionnelle par des protéases cellulaires et deux protéases virales afin de produire des protéines virales matures structurales et non-structurales. Les protéines structurales du VHC qui sont clivées par des peptidases signal de l'hôte, incluent la protéine Core (p19 dans sa forme mature) et les glycoprotéines d'enveloppe E1 (p35) et E2 (p70), qui constituent les composantes majeures des particules virales, indispensables pour l'entrée du virus (**Fig. 19**) (Hijikata et al., 1991; Lin et al., 1994).



**Figure 19:** Organisation du génome et de la polyprotéine du VHC

Le génome du VHC est constitué d'ARNsb positif d'une longueur de 9.6 kb. La traduction requiert la présence de l'IRES et produit une polyprotéine précurseur qui est par la suite clivée en protéines structurales et non-structurales matures, et ce, de façon co et post-traductionnelle. La particule virale est constituée de la protéine Core et des protéines d'enveloppe E1 et E2. Les protéines non structurales de NS3 à NS5B sont impliquées dans la réplication du virus, alors que les protéines p7 et NS2 sont impliquées dans l'assemblage de la particule virale. Figure adaptée de (Moradpour et al., 2007).

La protéine Core du VHC, dérivée de l'extrémité N-terminale de la polyprotéine, forme la nucléocapside virale. Le clivage et la maturation de cette protéine permettent son transport de la membrane du réticulum endoplasmique jusqu'à la surface des «lipid droplets» (gouttes lipidiques), site d'assemblage de la particule virale (McLauchlan et al., 2002; Miyanari et al., 2007) et représentant une sorte de réservoir intracellulaire de triacylglycérols et de cholestéryl esters entourés d'une simple couche de phospholipides (Barba et al., 1997; Moradpour et al., 1996). L'association entre Core et les «lipid droplets» est essentielle pour le recrutement des autres protéines virales et pour la production du virion, puisque des mutations dans Core empêchant l'association aux «lipid droplets» abolissent complètement la production de nouveaux virus (Boulant et al., 2007; Miyanari et al., 2007). Il est intéressant de mentionner que ces mêmes «lipid



droplets » sont essentiels à la sécrétion de lipoprotéines par les hépatocytes (Olofsson et al., 2008) et qu'il est donc envisageable qu'il y ait un point de rencontre entre ces deux phénomènes (Gastaminza et al., 2008; Huang et al., 2007a).

La séquence en acides aminés de Core est très conservée entre les différents génotypes du VHC et en comparaison avec d'autres protéines du virus. Le domaine N-terminal de Core est hautement basique, contrairement au domaine C-terminal qui est hydrophobe. Des études de localisation ont démontré que cette protéine, dont la forme prédominante est de 19 kDa, se retrouvait dans le cytoplasme en association avec le réticulum endoplasmique, les « lipid droplets » et les mitochondries. Cette protéine multifonctionnelle est non seulement impliquée dans la formation du virion, dans la réplication virale mais aussi dans la modulation de l'expression de gènes viraux et cellulaires impliqués entre autre dans la transformation cellulaire, l'apoptose et le métabolisme lipidique (Suzuki et al., 2007). Des formes alternatives de Core générées par des initiations de traduction sur des cadres de lecture alternatifs ont également été décrites (Branch et al., 2005). Ces protéines, désignées ARF-P ou protéines F (Alternative Reading Frame ou Frame shift) ont un rôle encore inconnu dans le cycle viral.

E1 et E2 sont des composantes essentielles de l'enveloppe du virion et sont nécessaires pour l'entrée du virus. Ce sont des protéines membranaires de type I, contenant un large domaine ectomérique à l'extrémité N-terminale, ainsi qu'un domaine transmembranaire à l'extrémité C-terminale. Au cours de leur synthèse, les ectodomains d'E1 et E2 sont dirigés vers la lumière du réticulum endoplasmique, alors que leurs domaines transmembranaires sont insérés dans la membrane de ce compartiment. La section N-terminale de la protéine E2 contient une région hypervariable appelée HVR1 qui contribue au mécanisme d'évasion de l'immunité innée par le VHC (Helle et Dubuisson, 2008). Les protéines d'enveloppe contiennent des sites de glycosylation hautement conservés permettant l'association de molécules de glycannes qui jouent un rôle essentiel dans le cycle de vie du VHC, au niveau du repliement des protéines, de l'entrée du virus et de la protection contre le processus de neutralisation par la cellule-hôte. En effet, la protéine E2 serait un ligand majeur qui s'attache à CD81 et à SR-B1, deux des récepteurs majeurs du VHC permettant son entrée (Brazzoli et al., 2005; Pileri et al., 1998).

Les extrémités N et C-terminales de la protéine p7, court polypeptide de 63 aa font face à la lumière du réticulum endoplasmique, indiquant la présence de deux domaines transmembranaires (Carrere-Kremer et al., 2002). p7 a la capacité d'oligomériser au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et de former des pores hydrophobes avec une activité de canal ionique

(Griffin et al., 2003; Pavlovic et al., 2003). Bien que p7 ne soit pas indispensable pour la réplication de l'ARN, elle est indispensable pour la production de particules virales infectieuses *in vitro* et *in vivo*, ce qui laisse suggérer qu'elle aurait un rôle potentiel dans l'assemblage et le relâchement des particules (Jones et al., 2007; Sakai et al., 2003; Steinmann et al., 2007).

### 2.2.3 Les protéines non-structurales du VHC

Les protéines non-structurales sont désignées NS2-NS5 et incluent : NS2 (p23), la protéase à sérine et hélicase à ARN NS3 (p70), le polypeptide NS4A (p8), NS4B (p27), la phosphoprotéine NS5A (p56 ou p58 dépendant de l'état de phosphorylation) et la polymérase NS5B (p68). Ces protéines sont relâchées après clivage par les protéases virales NS2-3 et NS3-4A (**Fig. 19** et **Fig. 20**).

#### 2.2.3.1 NS2

NS2 est une protéine transmembranaire d'environ 21-23 kDa. Sa portion N-terminale contient des hélices transmembranaires permettant d'ancrer la protéine au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Santolini et al., 1995). La portion C-terminale de NS2 contient un domaine protéase, qui, avec le domaine protéase de l'extrémité N-terminale de NS3 forme une protéase catalytiquement active apte à cliver la jonction NS2/NS3 (Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993). La cristallisation du domaine protéase en C-terminal de NS2 a révélé une structure dimérique dont les sites actifs font intervenir des résidus de chacun des monomères (Lorenz et al., 2006).

#### 2.2.3.2 NS3

La protéase NS3 de 69 kDa contient deux activités enzymatiques distinctes. Le tiers N-terminal de NS3 est une protéase à sérine qui est responsable du clivage de toutes les protéines en aval (NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B), et ce avec l'assistance d'un cofacteur attaché de façon non-covalente, NS4A. Les deux tiers de la protéine en C-terminal contiennent une hélicase à ARN/NTPase. Les activités protéase et hélicase sont toutes deux importantes pour la réplication (Kolykhalov et al., 2000; Lam et Frick, 2006).

NS3/4A est une protéase formée d'un hétérodimère stable composé de la partie N-terminale de NS3 et de la protéine NS4A. La triade catalytique est formée par les résidus His-1083, Asp-1107 et Ser-1165 de NS3. La région C-terminale encodée par les 442 derniers acides aminés comprend le

domaine à hélicase-NTPase, un membre de la superfamille des hélicases à 2 motifs DexH/D-box, dont la fonction est de dérouler les substrats ARN-ARN dans la direction 3' à 5'. En plus de son rôle de défaire les structures secondaires au cours de la réplication, le domaine hélicase serait également impliqué dans une étape précoce de l'assemblage (Ma et al., 2008). Au cours de la réplication de l'ARN, il a été suggéré que NS3 pouvait transloquer le long du substrat en changeant sa conformation et en utilisant l'énergie de l'hydrolyse des NTPs. Le domaine hélicase C-terminal de NS3 se replie de façon indépendante et se connecte au domaine protéase via un peptide « linker » (Yao et al., 1997; Yao et al., 1999).

La maturation de cette protéine virale est particulièrement intéressante. NS3 est tout d'abord clivée depuis la séquence polyprotéique en amont (le domaine NS2) par une activité protéase agissant exclusivement en *cis* et résidant principalement au niveau des résidus en carboxy-terminal de NS2. Il semblerait que l'activité enzymatique responsable de ce clivage proviendrait d'une protéase à cystéine formée par deux molécules NS2 (Lorenz et al., 2006). Ce dimère aurait deux sites actifs dans lesquels les résidus catalytiques His et Glu proviennent d'un membre du dimère, l'autre fournissant le résidu nucléophile Cys. Ainsi, deux copies de la polyprotéine doivent être produites avant qu'il y ait scission au point de jonction NS2-NS3, un prérequis pour le repliement du domaine amino-terminal de NS3 qui est une étape critique de la maturation de la protéase NS3/4A. La protéase NS3/4A clive par la suite en aval de la jonction NS3/4A à une vitesse relativement lente, ce qui permet le repliement du segment NS4A à l'intérieur de la protéase NS3 avant le réel clivage de la jonction NS3/4A (Wang et al., 2004b). La maturation du restant de la polyprotéine se fait par des clivages en *trans* suite à la reconnaissance des sites de clivage par NS3/4A.

L'activité protéase de NS3/4A joue également un rôle fondamental dans la subversion de l'immunité innée en clivant CARDIF (Foy et al., 2005; Seth et al., 2006), ce qui entraîne sa délocalisation en dehors de la membrane mitochondriale comme nous le verrons en détail plus loin. La protéase NS3/4A est également apte à cliver TRIF *in vitro*, et potentiellement *in vivo*, ce dernier point faisant toutefois l'objet d'un débat (Li et al., 2005b). Dans tous les cas, la protéase NS3/4A affecte très significativement la réponse antivirale de la cellule hôte, ce qui joue un rôle essentiel dans l'infection en favorisant la persistance virale.

### 2.2.3.3 NS4A

NS4A est un polypeptide de 54 acides aminés qui sert de co-facteur essentiel pour la protéase NS3. Son hélice transmembranaire à l'extrémité N-terminale hydrophobe permet d'ancrer

le complexe NS3-NS4A aux membranes intracellulaires où le clivage de la polyprotéine aura lieu ainsi que la réplication (Wolk et al., 2000). La région centrale de NS4A est hydrophobe et demeure requise pour l'activation de NS3 (Bartenschlager et al., 1994; Failla et al., 1994; Lin et al., 1995). L'extrémité C-terminale joue un rôle important dans la réplication du VHC en régulant la phosphorylation de NS5A (Koch et Bartenschlager, 1999; Lindenbach et al., 2007).

#### **2.2.3.4 NS4B**

La protéine NS4B est une protéine membranaire de 27 kDa qui contient au moins quatre domaines transmembranaires et des hélices amphipatiques à l'extrémité N-terminale, responsables de l'association de la protéine à la membrane (Elazar et al., 2004; Lundin et al., 2003). Sa fonction la plus connue est l'induction d'un compartiment membranaire spécialisé appelé « membranous web », qui est le site présumé de la réplication virale (Egger et al., 2002). Récemment, une interaction entre NS4B et l'ARN viral a été mise en évidence, et aurait un rôle important pour la réplication (Einav et al., 2008).

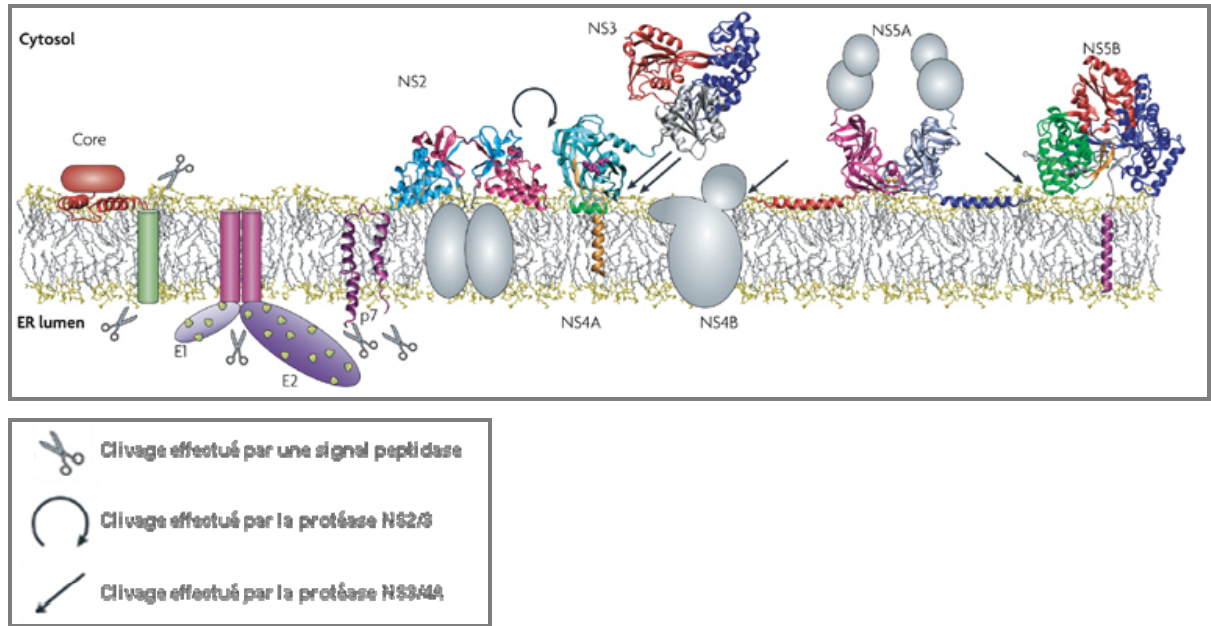
#### **2.2.3.5 NS5A**

NS5A ne contient aucun domaine transmembranaire mais est rattaché à la membrane intracellulaire par une hélice en N-terminal qui s'insère horizontalement dans la bicouche lipidique (Brass et al., 2002; Elazar et al., 2003). C'est une phosphoprotéine qui possède deux formes: la forme phosphorylée de base (56 kDa) et la forme hyperphosphorylée (58 kDa) (Kaneko et al., 1994). Si sa fonction n'est pas complètement élucidée, NS5A aurait un rôle important dans la réplication virale, puisqu'un grand nombre de mutations adaptatives y sont localisées et favorisent la réplication (Appel et al., 2005; Evans et al., 2004). Ces mutations adaptatives affectent souvent l'hyperphosphorylation de NS5A, suggérant que le statut de phosphorylation de la protéine influence l'efficacité de la réplication.

#### **2.2.3.6 NS5B**

La protéine NS5B est une polymérase à ARN viral ARN-dépendante (68-kDa) responsable de la synthèse du brin complémentaire négatif du génome comme intermédiaire de réplication, et de l'ARN génomique en utilisant le brin négatif comme gabarit. Une de ses caractéristiques majeure est son incapacité à reproduire les séquences génomiques fidèlement, ce qui mène à un nombre élevé de mutations et donc à un nombre élevé de variantes virales chez un même patient. La région de 21 aa à l'extrémité C-terminale de NS5B forme un domaine transmembranaire en hélice- $\alpha$  qui

n'est pas indispensable pour son activité polymérase *in vitro*, mais qui est responsable de sa localisation post-traductionnelle au niveau du réticulum endoplasmique (Moradpour et al., 2004). De nombreuses interactions entre NS5B et des facteurs de l'hôte ont été rapportées et seraient impliquées dans la réplication du VHC (Tang et Grise, 2009).



**Figure 20** : Structure et association membranaire des protéines du VHC

Les protéines dont la structure est connue apparaissent en ruban, et celles dont les structures n'ont pas encore été démontrées sont représentées par des sphères ou des cylindres de taille approximative. La protéine Core en rouge inclut deux hélices alpha-amphipatiques connectées par une boucle hydrophobe. Le peptide signal de la protéine E1 en vert est clivé par une peptidase à peptide signal. L'hétérodimère de la glycoprotéine E1-E2 est associé au niveau des extrémités C-terminales transmembranaires. Les points verts désignent des sites de glycosylation. Le monomère codant pour la viroporine p7 apparaît en violet et le domaine catalytique de NS2 a deux sous-unités présentées en bleu et magenta qui connectent par leur domaine N-terminal membranaire. Le domaine protéolytique de la protéase à sérine NS3 est montré en bleu cyan et est associé avec le domaine d'activation de la protéase NS4A et le domaine N-terminal transmembranaire de NS4A en jaune. La triade catalytique de la protéase à Sérine NS3 (His57, Asp81 et Ser139) est représentée par des sphères en magenta. Les trois domaines I, II et III de la portion à activité hélicase de NS3 sont colorés en argent, rouge et bleu respectivement. Cette représentation de NS3 indique bien que le domaine hélicase ne peut plus interagir avec le domaine NS3 protéase quand ce dernier est associé à la membrane par son hélice  $\alpha$ -amphipatique 11-21 en vert et au domaine transmembranaire de NS4A. NS4B apparaît avec son domaine N-terminal interagissant en plan avec la membrane, son domaine transmembranaire central ainsi que son domaine cytosolique en C-terminal. Le dimère du domaine I de NS5A ainsi que l'hélice- $\alpha$  amphipatique sont montrés et les domaines II et III de NS5A sont symbolisés par des sphères grises. Le domaine catalytique de la polymérase à ARN ARN-dépendante NS5B est associé avec la membrane par son segment transmembranaire en C-terminal. Les différentes structures du domaine catalytique apparaissent en bleu, rouge et vert respectivement. Le site catalytique de la polymérase repose au centre du domaine cytosolique alors que le site d'attachement de l'ARN est localisé verticalement sur la droite le long de la boucle  $\beta$  en orange et du domaine C-terminal du segment 545-562 (argent) qui connecte le domaine cytosolique au segment transmembranaire (magenta). Figure tirée de (Moradpour et al., 2007).

## 2.3 Le cycle viral du VHC

La cible principale du VHC demeure les hépatocytes, bien que des antigènes viraux aient été détectés dans les cellules sinusoidales endothéliales du foie, les cellules de Kupffer, de même que dans les leucocytes du sang périphérique, les lymphocytes B des ganglions lymphatiques, les cellules épithéliales de l'intestin ainsi que dans le cerveau (Cabot et al., 2000; Deforges et al., 2004; Forton et al., 2004; Laskus et al., 2000).

L'entrée du VHC dans la cellule hôte est un processus hautement complexe et régulé qui n'est pas encore totalement compris. Les études de cet aspect de l'infection sont limitées par le fait que les étapes d'attachement et de pénétration du virion varient considérablement selon le modèle expérimental utilisé ainsi que selon l'environnement dans lequel se fait l'interaction entre le virus et l'hôte. Par exemple, chez un patient infecté avec le VHC, le virus circule soit sous une forme dite libre ou bien complexé avec des immunoglobulines ou encore des lipoprotéines à haute, faible ou très faible densité. Il y a donc un degré de complexité supplémentaire lorsque l'on considère l'infection *in vivo*, où l'on sait que le virus utilise différents facteurs sériques afin à la fois d'élargir ses possibilités d'interaction avec de potentiels récepteurs, mais aussi de contourner la réponse immunitaire et de passer inaperçu devant l'activité neutralisante des anticorps (Dreux et al., 2006).

### 2.3.1 L'entrée du virus

L'attachement initial du virion requiert la présence de glycosaminoglycannes ainsi que de récepteurs à lipoprotéines de faible densité (LDLs). Le mécanisme d'entrée consiste ensuite en des interactions séquentielles avec - le récepteur « scavenger de classe B et de type I » appelé SRB1 (Scarselli et al., 2002) qui est un récepteur à la fois pour les LDLs acétylées et oxydées, mais aussi pour les lipoprotéines à haute densité (HDLs), - les GAGs présents à la surface des cellules, - la tétraspanine CD81 (Pileri et al., 1998) - les protéines Claudin -1, -6 et -9 (CLDN1, 6 et 9) (Evans et al., 2007; Zheng et al., 2007) et finalement - l'occludine (Ploss et al., 2009). CLDN1, qui jouerait un rôle à une étape tardive du processus d'entrée, est exprimée de façon prépondérante dans le foie et appartient à une famille de protéines responsable de la formation des jonctions serrées (Dubuisson et al., 2008). De récentes études ont également permis de mettre en évidence le rôle de l'occludine, une autre composante des jonctions serrées structurellement familière avec les Claudines et jouant un rôle important au cours de l'entrée du VHC dans les cellules ainsi que lors de l'initiation d'une infection productive (**Fig. 21**) (Liu et al., 2009).

Les lectines sont une autre classe de molécules impliquées dans l'attachement et l'entrée de nombreux virus. Le rôle des lectines de type C comme DC-SIGNR, L-SIGN, et ASGPR a également été mis en évidence dans le cas d'une infection avec le VHC (Gardner et al., 2003; Pohlmann et al., 2003; Saunier et al., 2003). Une fois les particules virales attachées aux récepteurs, l'entrée du virus dans la cellule se fait par l'intermédiaire d'un mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine, suivi par une étape de fusion avec un compartiment endosomal acide (Blanchard et al., 2006).

### 2.3.2 La traduction et la réplication

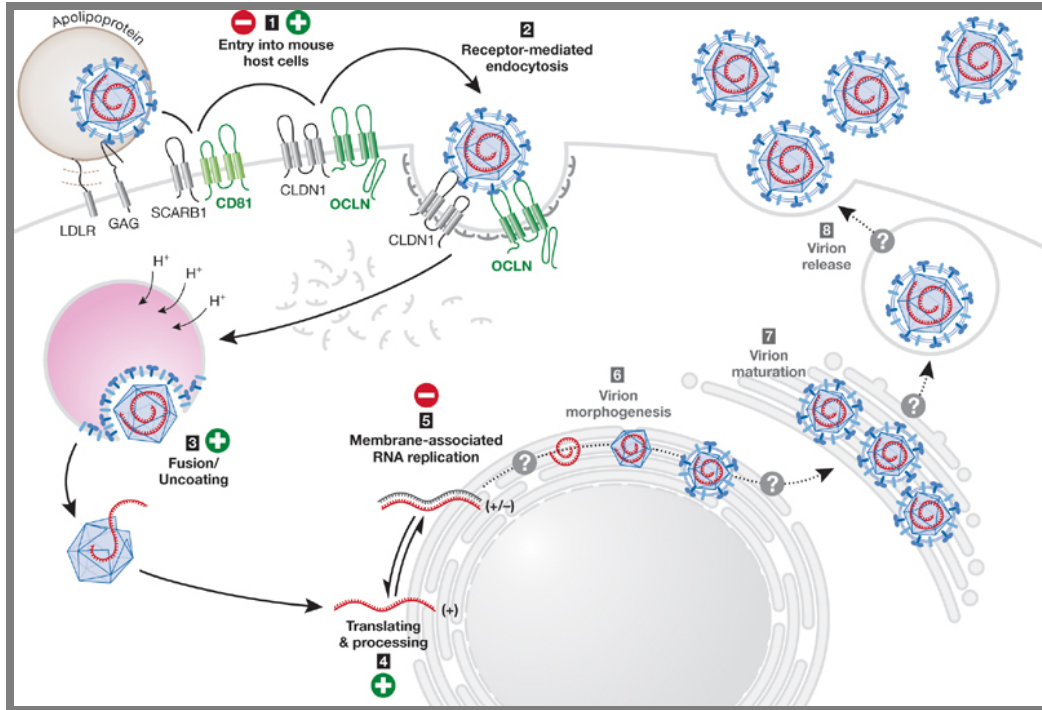
Suite à l'entrée du VHC dans la cellule, le génome est libéré dans le cytoplasme et la traduction prend place suite à l'attachement du ribosome sur l'IRES à l'extrémité 5' terminale de l'ARN, et ce au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (**Fig. 21**). La formation du « membranous web » servira d'échafaudage favorisant à la fois la réplication virale, la compartimentalisation, la concentration locale de produits viraux, l'approvisionnement en constituants lipidiques ainsi que la protection contre les mécanismes de détection des ARNs cytoplasmiques par la cellule hôte (Egger et al., 2002). Ces complexes de réplication permettent l'amplification de brins positifs d'ARN à partir de gabarits de brins négatifs. Les génomes viraux nouvellement formés pourront soit être utilisés pour la production de nouvelles copies de polyprotéines, soit servir de modèle pour la synthèse de nouvelles copies de brins négatifs d'ARN ou encore être incorporés dans les nucléocapsides en vue du relâchement de particules virales (**Fig. 21**).

Une étude récente portant sur la dynamique des complexes de réplication du VHC a permis d'identifier, grâce à l'insertion d'une fusion GFP dans la protéine NS5A, deux types de complexes de réplication dans les cellules portant un réplicon: le premier type comporte de larges structures membranaires et présente à la fois une faible motilité et une stabilité de plusieurs heures, alors que le second comporte des structures plus petites à plus grande mobilité, plus rapides et parcourant de plus longues distances. Ces deux populations de complexes membranaires sont associées avec les structures tubulaires du réticulum endoplasmique (Wolk et al., 2008).

### 2.3.3 Assemblage et relâchement

Les hépatocytes jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie lipidique de l'organisme en assemblant et en sécrétant des VLDLs. Un parallèle a été fait entre l'assemblage des VLDLs et celui du VHC. En effet, Huang et al. ont récemment purifié des complexes membranaires au niveau desquels ont été retrouvés des protéines virales non structurales, de l'ARN viral ainsi que de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme lipidique des hépatocytes (Huang et al., 2007a). Par ailleurs, une diminution de la protéine ApoB, une protéine majeure des VLDLs, empêche l'assemblage des particules virales (Gastaminza et al., 2008). La participation de différentes apolipoprotéines dans l'assemblage de particules virales *in vitro* a d'ailleurs été récemment démontrée par la neutralisation de l'infectivité en présence d'anticorps dirigés contre ApoB, ApoE ou ApoCI (Chang et al., 2007a; Meunier et al., 2008). Finalement, l'assemblage de la nucléocapside implique généralement une oligomérisation des protéines de la capsidite suivi d'une encapsidation de l'ARN génomique. Ce processus serait déclenché par l'interaction entre la protéine Core et l'ARN viral (Suzuki et al., 2007). Une fois la nucléocapside formée dans le cytoplasme, elle acquiert une enveloppe et bourgeonne à travers les membranes intracellulaires et est finalement relâchée par la voie de sécrétion constitutive de la cellule.





**Figure 21** : Représentation du cycle viral du VHC

L'entrée du VHC dans la cellule hôte est initiée par l'attachement des particules virales à des molécules de surface. Les glycosaminoglycannes pourraient permettre une liaison initiale à la membrane cellulaire, suivi de l'attachement du virion à d'autres récepteurs comme CD81, SR-B1 qui interagiraient avec la glycoprotéine d'enveloppe E2. Les protéines de jonction Claudin-1 et Occludine ont été identifiées plus récemment comme des facteurs d'attachement additionnels. Suite à une entrée chlatrine-dépendante ainsi qu'une acidification de la vésicule, il y a finalement libération du matériel viral. La traduction puis la réplication virale se font au niveau de complexes membranaires appelés « membranous web ». Les étapes plus tardives d'assemblage, de maturation puis de relâchement de particules sont encore peu connues. Figure tirée de (Ploss et Rice, 2009).

## 2.4 Modèles d'étude du VHC

De façon générale, lors de la découverte d'un virus, l'obtention de clones moléculaires fonctionnels des génomes viraux ainsi que de mutants dérivés sont des outils essentiels à l'étude du cycle viral. Dans le cas du VHC, il a été laborieux d'obtenir de tels outils: 1- la faible quantité d'ARN viral retrouvée dans les tissus des patients infectés a nécessité des préamplifications précédant le clonage, augmentant ainsi l'incidence des mutations, 2- la grande variabilité du génome du VHC a compliqué l'amplification du génome, 3- la déféctuosité d'une grande majorité de génomes proviraux relâchés a diminué la probabilité d'obtenir des clones fonctionnels (Aaskov et al., 2006; Hayashi et al., 1993; Yagi et al., 2005), 4- la complexité structurale de certaines régions du génome du VHC, entre autres la X-tail et les séquences de nucléotides répétées poly(U/UC), ont considérablement compliqué le clonage.

### 2.4.1 Le concept du génome consensus et ses limites

La propagation du clone viral en culture fut hasardeuse, dû à des mutations provenant soit de l'étape de l'amplification du génome par PCR ou bien du génome viral initial à cause du nombre important de particules défectueuses. C'est de là qu'est né le concept de génome consensus, qui fut obtenu par séquençage et alignement de plusieurs génomes viraux clonés : le H77 fut le premier génome de génotype 1a isolé et apte à établir une infection productive après inoculation à des chimpanzés (Kolykhalov et al., 1997; Yanagi et al., 1997).

Par la suite, de nombreux efforts ont été accomplis afin d'augmenter le nombre de particules virales suite à la transfection de génomes viraux dans des lignées hépatocytaires immortalisées. Ainsi, dans la première génération de réplicons appelés Con1 dérivés du génotype 1b, la région allant des protéines Core à p7 a été remplacée par le gène codant pour la néomycine phosphotransférase sous le contrôle de l'IRES du VHC alors que la polymérase a été placée sous le contrôle de l'IRES du virus EMCV (**Fig. 22**). Le marqueur de sélection a permis d'obtenir des cellules contenant de hauts niveaux d'ARN viral (1000-5000 molécules de brins positifs par cellule) et sur de longues périodes puisque cette construction bicistronique peut être maintenue dans les cellules pendant plusieurs années (Pietschmann et al., 2001). Par la suite, un autre réplicon dérivé d'un isolat de génotype 1b (HCV-N) a démontré une meilleure efficacité de réplication en culture, dû à une mutation dans la protéine NS5A, conférant ainsi une adaptation supplémentaire en culture cellulaire (Guo et al., 2001; Ikeda et al., 2002). Cette découverte ouvra les portes à l'étude des mutations dites adaptatives, conservées à travers tous les génomes viraux présents dans un clone donné. Ces mutations, une fois insérées dans le génome parental, ont permis d'augmenter significativement le niveau de réplication virale (Blight et al., 2000; Blight et al., 2003; Grobler et al., 2003; Gu et al., 2003; Guo et al., 2001; Ikeda et al., 2002; Kato et al., 2003a; Kishine et al., 2002; Lohmann et al., 2003; Lohmann et al., 2001).

Le mécanisme exact expliquant l'impact de ces mutations adaptatives sur la réplication n'est pas entièrement compris, mais on a suggéré que ces mutations, souvent localisées en surface des molécules et loin de leur site actif, pourraient modifier les interactions entre les protéines virales et cellulaires (Blight et al., 2003; Lohmann et al., 2003). Vu les hauts niveaux de réplication obtenus avec ces mutants adaptatifs, on peut se demander pourquoi de tels mutants n'ont jamais été identifiés chez des patients. En fait, le maintien d'un certain niveau d'ARN et de protéines virales représenterait un mécanisme de contre-sélection et serait fondamental afin d'éviter le déclenchement d'une réponse de type immunitaire, stress ou apoptose dans la cellule infectée.

D'autre part, de très hauts niveaux d'ARN pourraient modifier la conformation des complexes de réplication viraux et pourraient interférer avec la formation de particules virales. D'ailleurs, des réversions de certaines mutations ont pu être observées *in vivo*, indiquant donc que ces dernières ne sont pas nécessairement favorables à une bonne infectivité dans un contexte physiologique (Bukh et al., 2002).

Bien que ces réplicons subgénomiques soient des outils tout à fait valables, l'objectif était toutefois la mise en place d'un système de culture cellulaire permettant la production de particules virales infectieuses. Ainsi, des lignées de Huh7 aptes à répliquer de façon stable en présence de G418 des réplicons génomiques complets du VHC furent générées (**Fig. 22**) (Blight et al., 2003; Ikeda et al., 2002; Pietschmann et al., 2002). En effet, ces ARNs différaient des réplicons subgénomiques dans la mesure où le cadre de lecture complet du VHC était retrouvé et non uniquement la région codante NS3-5B. Cela dit, aucune production de particules virales infectieuses ne fut obtenue. De plus, malgré l'introduction de mutations adaptatives visant à augmenter les niveaux de réplication, ceux-ci restèrent cinq fois plus faibles que ceux des réplicons subgénomiques (Blight et al., 2003; Ikeda et al., 2002; Pietschmann et al., 2002).

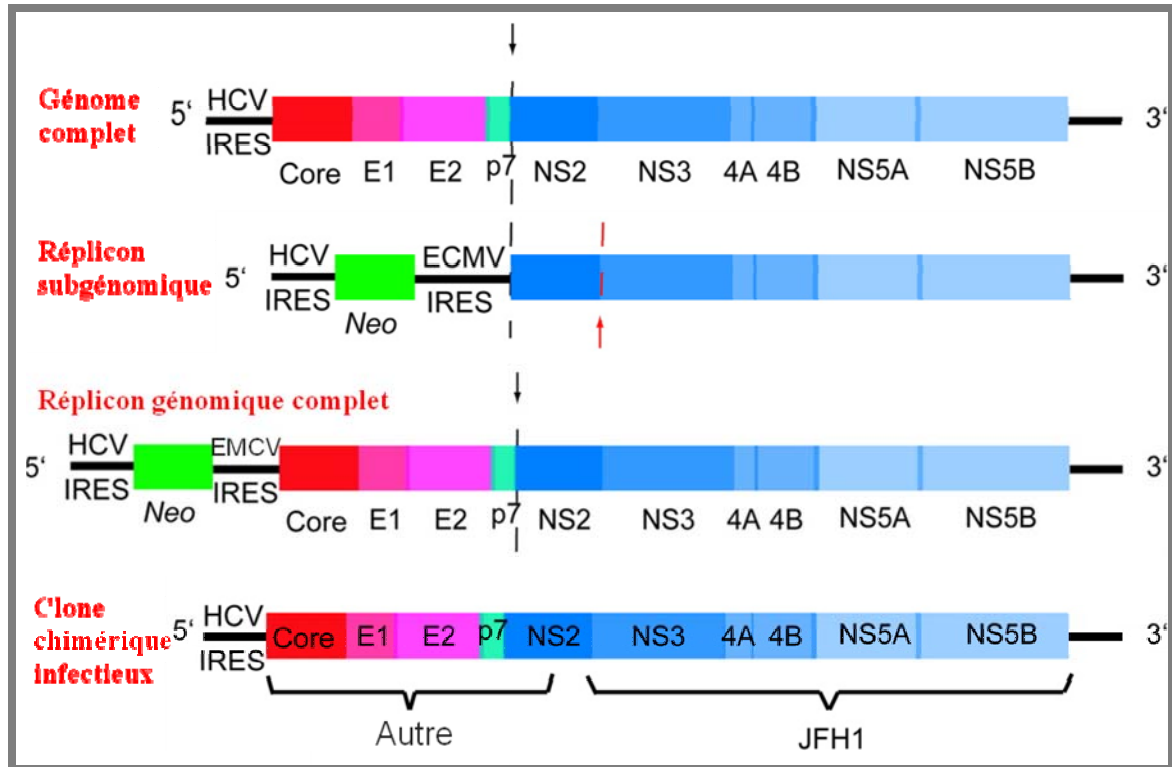
#### 2.4.2 Premier clone infectieux *in vitro* : JFH1

Kato et al., ont réussi à obtenir un clone du VHC de génotype 2a apte à produire des particules infectieuses à partir du sérum d'un patient japonais atteint d'hépatite C fulgurante (Japanese Fulminant Hepatitis) (Kato et al., 2003b; Kato et al., 2001). La particularité de ce réplicon appelé JFH1 est qu'il ne nécessite aucune mutation adaptative pour être infectieux, contrairement à tous les réplicons de génotype 1, et qu'il permet d'obtenir pour la première fois une infection productive *in vitro*. Le clone du JFH-1 est à la fois apte à produire des virions infectieux, à se propager dans différentes cultures de lignées Huh7 mais aussi à infecter le chimpanzé (Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005) (**Fig. 22**).

À partir du JFH1, plusieurs avancées ont pu être possibles, comme la construction de génomes viraux contenant un gène rapporteur (luciférase ou GFP) permettant une mesure précise de la réplication virale (Koutsoudakis et al., 2006; Wakita et al., 2005), ou encore la construction de chimères à partir d'autres isolats infectieux du VHC (Lindenbach et al., 2005; Pietschmann et al., 2006). La chimère la plus infectieuse obtenue fut la J6-JFH1, appelée Jc1 (Pietschmann et al., 2006). Des génomes viraux infectieux dérivant de H77, Con1, J6 et 452 (nouveau génotype 3) ont pu être produits avec des niveaux de réplication comparables mais une infectivité toutefois très

variable. L'authentique génome du JFH1 pleine longueur et la chimère J6-JFH1 sont infectieux à la fois chez le chimpanzé et chez le modèle de souris contenant des xénogreffes d'hépatocytes humains (Lindenbach et al., 2006; Mercer et al., 2001).

La découverte du JFH1 a tout de même soulevé une question importante, à savoir si cet isolat contient un élément-clé, une exception rare comparé aux autres isolats et qui serait responsable de l'infectivité de ce clone. Il semblerait en effet que contrairement aux autres isolats, le JFH1 est totalement indépendant de la cyclophiline, un facteur cellulaire pourtant important au cours de l'interaction virus/hôte (Ishii et al., 2006), ainsi que des fluctuations du métabolisme cellulaire lipidique de l'hôte (Kapadia et Chisari, 2005). Ces limitations soulignent le fait qu'un objectif à ne pas perdre de vue serait d'infecter des hépatocytes avec des virions « naturels », c'est-à-dire provenant de patients infectés (Durantel et Zoulim, 2007).



**Figure 22 :** Représentation des modèles d'étude du VHC

Structure du réplicon sous-génomique et de la chimère pleine longueur dérivée du génome consensus du JFH1. Dans le réplicon sous-génomique initial, dérivé du Con1 (génotype 1b), les protéines structurales (C, E1, E2 et p7) ont été remplacées par un gène de résistance à l'antibiotique néomycine. Une seconde séquence IRES hétérologue (EMCV) a été introduite pour diriger la traduction des protéines non-structurales restantes. Dans certains réplicons, la région codante pour NS2 a aussi été éliminée (flèche rouge). Ces constructions permettent un haut niveau de réplication dans la lignée hépatocytaire Huh7. Les mutations adaptatives le plus souvent retrouvées au niveau des régions NS3, NS4B et NS5A favorisent également le haut niveau de réplication. Le réplicon génomique complet comprend les protéines structurales sans permettre la production de particules virales infectieuses et donne un rendement répliatif plus faible que le réplicon sous-génomique. À l'opposé, le génome consensus du JFH-1 donne un rendement répliatif élevé, sans nécessiter de mutations adaptatives et permet la production d'un cycle viral complet. L'infectivité du JFH-1 (Clone chimérique infectieux) est significativement augmentée avec la création de chimères en remplaçant la région core-NS2 avec celle de l'isolat du J6. Figure adaptée de (Boonstra et al., 2009).

### 2.4.3 La permissivité des cellules au VHC

La permissivité des cellules est un facteur important qui peut contribuer à l'efficacité de la réplication (Blight et al., 2003; Blight et al., 2002; Lohmann et al., 2003; Murray et al., 2003). Il a été observé que suite au traitement de cellules Huh7 portant un réplicon avec de l'IFN, les cellules saines résultantes permettent d'obtenir de plus hauts niveaux de réplication que les cellules parentales. C'est ainsi que deux grandes lignées hépatocytaires ont été générées à partir des Huh7, les Huh7.5 et les Huh7-lunet (Blight et al., 2002; Friebe et al., 2005). La propagation du VHC dans une lignée cellulaire autre que les Huh7 s'avère être assez difficile. En effet, dû à sa faible capacité de répondre à l'ARNdb, cette lignée cellulaire est particulièrement permissive pour le VHC (Foy et

al., 2003; Lanford et al., 2003; Sumpter et al., 2005). Il a en effet été démontré que les Huh7.5 possèdent une mutation rendant le récepteur à ARN cytoplasmique RIG-I inactif (Bartenschlager et Sparacio, 2007). Le premier réplicon fonctionnel dans des cellules autres que les Huh7 fut décrit par Zhu et al., qui isolèrent un faible nombre de clones résistant au G418 dans des HeLa et des Hepa 1-6, une lignée hépatocytaire murine. Il est donc possible que la réplication du VHC ne soit pas uniquement restreinte à des cellules hépatocytaires humaines ou provenant de primates (Zhu et al., 2003).

L'établissement d'un réplicon dans d'autres lignées que les Huh7 fut par contre plus aisé en utilisant le JFH1, apte à se répliquer dans des HepG2, des HEK293 et des HeLa, tout comme dans des MEFs, bien qu'avec des efficacités variables (Chang et al., 2006; Date et al., 2004; Kato et al., 2005). De plus, tout comme dans les Huh7, de nombreux réplicons isolés de ces autres lignées cellulaires ne contenaient pas de mutations adaptatives. Les systèmes actuels infectieux les plus couramment utilisés dans les lignées dérivées des Huh7 sont : le JFH1 de génotype 2a (Wakita et al., 2005), le clone H77-S de génotype 1a et contenant 5 mutations adaptatives (Yi et al., 2006) ou encore le clone de génotype 1B (Murakami et al., 2006).

Par ailleurs, Aly et al. ont développé une lignée hépatocytaire immortalisée avec le virus du papillome humain (HPV) 18/E6E7 également susceptible à l'infection avec le VHC (Aly et al., 2007). La susceptibilité de cette lignée a d'ailleurs pu être augmentée en inhibant le facteur de transcription-clé IRF7.

Les équipes de Fournier et al., et de Molina et al. ont débuté la culture du VHC sur des hépatocytes primaires humains sans néanmoins obtenir les résultats escomptés. En effet, moins de 15% des sérums utilisés pour l'infection étaient infectieux, l'amplification virale ne dépassait pas 1 log<sub>10</sub>, et l'infection déclinait après 8 jours sans aucune évidence de production de particule virale (Fournier et al., 1998; Molina et al., 2007; Molina et al., 2008). Plus récemment, Buck a finalement démontré qu'il était possible d'infecter des cultures d'hépatocytes primaires humains isolés à partir d'explants normaux de foies avec des sérums de patients chroniquement infectés avec le VHC de génotypes 1, 2, 3 et 4. En effet, après 24 hrs d'exposition avec un sérum infectieux, des marquages anti-E2, Core et NS3 étaient visibles au microscope confocal. De plus, suite à l'ajout d'un anticorps dirigé contre le CD-81 ou E2 ou encore suite à une déplétion de cholestérol, l'infection de ces cultures d'hépatocytes primaires pouvait être complètement bloquée (Buck, 2008).

Lazaro et al. ont démontré qu'il était possible d'infecter une culture d'hépatocytes humains fœtaux par transfection d'ARN du VHC ou exposition à des sérums provenant de patients

chroniquement infectés avec le VHC (Lazaro et al., 2007). Ce type cellulaire a l'avantage de maintenir son phénotype pendant plusieurs mois, concomitant avec l'expression de CD81 et de récepteurs à lipoprotéines de faible densité, éléments essentiels à l'entrée du virus. Les niveaux de particules relâchées dans le milieu varient de façon cyclique et peuvent être détectés sur des périodes allant de un à deux mois de culture. La détection de protéines et d'ARN du VHC a pu être démontrée dans 10 à 20% des cellules, avec une localisation en groupe (« clusters ») de cellules infectées.

Finalement, on a très récemment développé un système miniature de co-culture de tissu hépatique humain permettant de conserver les fonctions phénotypiques hépatocytaires pendant plusieurs semaines (MPCCs pour MicroPatterned CoCultures). Les hépatocytes primaires humains sont cultivés sur des plaques recouvertes de collagène, en co-culture avec des fibroblastes murins et se retrouvent donc entourés d'un stroma qui se rapproche d'un milieu physiologique et leur permet donc de conserver leur polarisation. Cependant, uniquement 1 à 5% des hépatocytes en MPCCs ont pu être infectés avec le VHC, ce qui reste relativement faible (Ploss et al., 2010).

#### **2.4.4 Les modèles animaux**

Jusqu'à très récemment, aucun modèle animal ne permettait l'étude approfondie du cycle viral du VHC et de sa propagation. Un modèle intéressant de souris chimériques (uPA-SCID mouse chimera) dans lesquelles le foie murin est reconstruit à partir d'hépatocytes primaires humains a permis de reconstituer en partie un modèle animal capable de supporter la réplication virale et de présenter de surcroît des caractéristiques d'hépatite virale humaine (Lindenbach et al., 2006; Mercer et al., 2001; Meuleman et al., 2005). L'infection de singes du Nouveau Monde (New World monkeys) avec le virus du GBV-B apparenté au VHC a également permis d'investiguer certains éléments de la pathogénèse de l'hépatite C (Bukh et al., 1999).

Le chimpanzé reste encore le modèle le plus précieux disponible pour l'étude de la pathogénèse et de l'efficacité de molécules antivirales, tout en étant très peu accessible pour des raisons éthiques, économiques mais aussi réglementaires. Notons également que les chimpanzés infectés avec le VHC ne développeront pas de maladie sévère du foie telle qu'observé chez l'humain (Walker, 1997); en effet, la nécro-inflammation du foie y est moindre et la progression vers la fibrose y est beaucoup plus lente. De plus, chez le chimpanzé infecté avec le VHC, la réponse immunitaire humorale est restreinte et la séroconversion contre les protéines structurales est minimale (Bukh, 2004). Par ailleurs, si l'IFN $\alpha$  pégylé associé à la ribavirine reste le traitement de

choix contre le VHC chez l'humain, ce traitement s'est avéré relativement inefficace chez le chimpanzé, aucun des traitements basés sur l'IFN $\alpha$  n'ayant jamais abouti à une diminution de la charge virale significative chez cet animal, et ce, malgré de hauts niveaux d'IFN $\alpha$  circulant sur des périodes parfois très longues (Chavez et al., 2009; Demers et al., 2002; Lanford et al., 2001; Lanford et al., 2009; Lanford et al., 2003; Lanford et al., 2006).



## 3 Interaction entre VHC et immunité antivirale

Le VHC provoque une hépatite chronique chez plus du tiers des patients, tout en échappant dans de nombreux cas au traitement de choix. Le développement et la persistance de cette infection chronique résulte clairement d'une incapacité des réponses immunitaires innées et acquises à contrôler l'infection et la réplication virale au cours de la phase aiguë de la maladie, puis tout au long de la phase chronique. Il est en effet maintenant clair que le VHC joue un rôle actif dans l'évasion du système immunitaire, par la mise en place de mécanismes de subversion multiples et complexes: l'introduction de mutations pour détourner sa reconnaissance par le système immunitaire, le masquage des virions avec des particules lipidiques, le clivage d'adaptateurs-clé dans les voies de signalisation impliquées dans la détection du virus, la manipulation de ces voies, la modulation des niveaux de cytokines produites et bien d'autres mécanismes.

Dans cette section, nous aborderons donc les mécanismes de reconnaissance du VHC par la cellule hôte d'une part, mais aussi les différentes techniques de subversion de l'immunité innée mises en place par le VHC. D'autre part, les mécanismes impliqués lors de l'activation de l'immunité innée et adaptative jouent un rôle essentiel à la fois dans la résolution de la maladie mais aussi dans son développement puisque l'inflammation engendrée cause également de sérieux dommages au foie. Nous adresserons donc successivement les réponses immunitaires induites au cours de l'infection avec le VHC, leur modulation par le virus et leur impact sur la progression de la maladie.

### 3.1 Les grandes lignes du système immunitaire inné hépatique

#### 3.1.1 Types cellulaires et immunité innée dans le foie

L'organisation structurale du foie joue un rôle fondamental pour sa fonction immunitaire (**Fig. 23**). Dû à son lien anatomique avec l'intestin, le foie est constamment exposé aux produits bactériens dérivés de l'intestin et fonctionne à la fois comme un organe de filtration majeur et comme une première ligne de défense. En effet, 80% des endotoxines injectées par voie intraveineuse chez des souris se retrouvent dans leur foie en l'espace de 20 à 30 minutes (Mathison et Ulevitch, 1979; Ruiter et al., 1981). Le foie héberge également 80% des macrophages de l'organisme appelés « cellules de Kupffer ». Un foie sain exprime de faibles niveaux d'ARNm codant pour la majorité des TLRs ainsi que pour les molécules de signalisation comme MD-2 et

MyD88, un fait qui contribue à la haute tolérance du foie aux ligands des TLRs dérivant des microorganismes intestinaux auxquels le foie est constamment exposé (Mencin et al., 2009).

Les hépatocytes sont des cellules hautement spécialisées qui remplissent à la fois les fonctions métaboliques et détoxifiantes du foie. En effet, ils jouent un rôle fondamental dans le traitement des endotoxines, visant à les éliminer de la circulation sanguine et à les sécréter sous forme de bile. Étant constamment exposés à des ligands d'origine bactérienne et bien qu'exprimant les TLR2 et 4, ce qui fut confirmé *ex vivo* par cytométrie en flux, les hépatocytes répondent peu aux LPS (Matsumura et al., 2003; Matsumura et al., 2000). Cela dit, bien que les modèles expérimentaux aient confirmé l'expression d'ARNm codant pour les TLR1-9 dans des extraits totaux de foie, la présence et la fonctionnalité de tout l'éventail des TLRs restent encore peu définies dans des hépatocytes humains purifiés (Seki et Brenner, 2008). En effet, l'étude de ce type cellulaire demeure limitée par sa difficulté d'isolation ainsi que par son statut de cellule quiescente une fois mise en culture.

Le TLR3 est apte à reconnaître l'ARNdb et joue un rôle fondamental dans l'immunité innée antivirale. Notre étude nous a permis de démontrer que le TLR3 est fonctionnel dans les hépatocytes primaires et que sa stimulation par du poly(I:C) extracellulaire induit la synthèse d'IFN type I, d'ISGs, de cytokines pro-inflammatoires et de chemokines (Jouan et al., 2009). De plus, l'étude de Wang et al. a permis de localiser le TLR3 par microscopie électronique dans la région périnucléaire des hépatocytes aussi bien sur des sections de foie congelées que sur des hépatocytes primaires humains en culture (Wang et al., 2009).

Les cellules hépatiques stellaires sont localisées dans l'espace de Disse et représentent la principale source cellulaire de production de protéines de la matrice extracellulaire, comme le collagène de type I, III et IV dans le foie (Bataller et Brenner, 2005). Ces cellules expriment les TLR4 et 9. Suite à une stimulation de leur TLR4, ces cellules produiront des médiateurs pro-inflammatoires, comme des chemokines (CCL2, CCL3 et CCL4), des molécules d'adhésion (VCAM-1), des molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM-1 et E-selectin) ainsi que des molécules pro-fibrogéniques (Seki et Brenner, 2008). De plus, une stimulation via TLR4 ou l'ajout de TNF $\alpha$  augmente l'expression du TLR2 dans ces cellules (Seki et al., 2007). La signalisation par le TLR9 augmente leur production de collagène mais inhibe leur migration ce qui a pour effet de moduler le processus de fibrose du foie (Watanabe et al., 2007). Suite à un dommage hépatique, les cellules hépatiques stellaires suivent un processus d'activation et deviennent le type cellulaire producteur de matrice extracellulaire majeur dans le foie. Il est d'ailleurs proposé que le

développement d'une fibrose du foie soit principalement associé à ces cellules dans certaines conditions d'exposition au LPS et ou à d'autres ligands des TLRs (Schwabe et al., 2006).

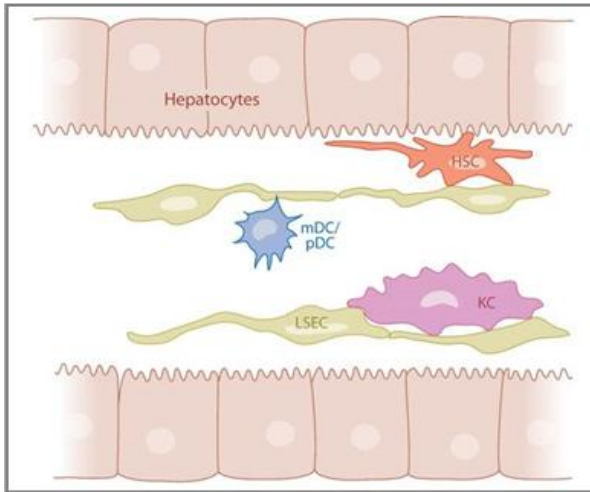
Les cellules épithéliales biliaires forment le tractus biliaire permettant la sécrétion de bile dans la lumière intestinale. Ces cellules expriment les TLRs 1 à 10 et leur réponse aux PAMPs bactériens est contrôlée entre autre par le phénomène de tolérance aux LPS (Chen et al., 2005b; Harada et al., 2006a; Harada et al., 2006b).

Les cellules endothéliales sinusoïdales forment la couche fenestrée des sinusoïdes hépatiques et ont un rôle important dans la fonction de perfusion hépatique et dans l'apport en nutriments. Ces cellules expriment constitutivement le TLR4 et le CD14 ainsi que le TLR9 (Martin-Armas et al., 2006; Uhrig et al., 2005). Les ARNm codant pour les TLR1-9 ont été détectés dans ces cellules et la fonctionnalité du TLR3 y a été démontrée. En effet, des surnageants provenant de cellules endothéliales sinusoïdales traitées avec du poly(I:C) réduisaient significativement la réplication du HBV dans des hépatocytes immortalisés (Wu et al., 2007). De façon intéressante, dans ce type cellulaire, la tolérance au LPS n'est pas régulée au niveau de l'expression du TLR4 mais plutôt liée à l'expression de prostanoïdes (Uhrig et al., 2005).

Les DCs hépatiques sont les CPAs du foie. Au cours d'une inflammation, ces cellules sont recrutées au niveau des sinusoïdes hépatiques d'où elles peuvent migrer vers les espaces périportaux et péricentraux. Les DCs hépatiques CD11c+/CD11b+ expriment le complexe TLR4/MD-2 et répondent aux LPS, aux peptidoglycannes, au poly(I:C) et à l'ADN CpG en produisant des cytokines inflammatoires comme l'IL12, le TNF $\alpha$ , ainsi qu'en exprimant les molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 à leur surface (De Creus et al., 2005; Schwabe et al., 2006). Les cellules dendritiques du foie expriment moins d'ARNm codant pour le TLR4, ce qui corrèle avec une réduction de la réponse immune acquise hépatique en réponse au LPS.

Les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie localisés au niveau des sinusoïdes hépatiques et ont les rôles essentiels de phagocytose, de présentation d'antigènes et de production de médiateurs pro-inflammatoires incluant des cytokines, des prostanoïdes, de l'acide nitrique ainsi que des dérivés actifs de l'oxygène (Bilzer et al., 2006; van Egmond et al., 2000). Ces cellules sont aussi les premières à rencontrer les toxines provenant des intestins, dont les LPS, et expriment le TLR4 (Su et al., 2000). Les cellules de Kupffer, qui expriment également les TLR2, 3 et 9 (Jiang et al., 2003; Schuchmann et al., 2004), sont responsable de l'expression de la majorité des cytokines et des chemokines du foie suite à une injection de LPS, comme l'ont démontré des expériences de déplétion (Kopydlowski et al., 1999). Cela dit, en comparaison avec les monocytes

du sang périphérique, les cellules de Kupffer expriment peu de CD14 (Lichtman et al., 1998). De plus, des cellules de Kupffer fraîchement isolées sécrètent la cytokine anti-inflammatoire IL-10 en réponse au LPS, ce qui contribue significativement à la diminution de cytokines pro-inflammatoires (Knolle et al., 1995). Ainsi, les cellules de Kupffer ont un seuil de tolérance au LPS plus élevé, adapté à leur environnement particulier constamment exposé aux LPS, même dans des conditions physiologiques.



**Figure 23 :** Le système immunitaire du foie

Le foie contient plusieurs types de cellules dendritiques incluant les cellules myéloïdes et plasmacytoïdes (mDCs et pDCs). On retrouve également les cellules de Kupffer (KCs) qui sont des phagocytes mononucléés qui expriment des molécules de co-stimulation. En plus, on retrouve deux populations d'APCs (Antigen Presenting Cells), les LSECs (Liver Sinusoïdal Endothelial Cells) et les HSCs (Hepatic Stellate Cells). Figure tirée de (Crispe, 2009).

### 3.1.2 Immunité innée dans les lignées hépatocytaires

Les lignées cellulaires dérivées d'hépatocarcinomes diffèrent clairement de leur homologue primaire. Elles se distinguent entre autres par leur capacité de prolifération élevée, la dérégulation de l'expression de certains gènes, leurs dysfonctions mitochondriales et la modification de certaines de leurs voies de signalisation et d'endocytose (Buck et Chojkier, 1996; Buck et al., 2001a; Buck et al., 2001b; Damm et al., 2005; Jones et al., 1998; Kroemer et Jaattela, 2005). Les lignées hépatocytaires Huh7 et leurs dérivées comportent de nombreuses modifications comme l'absence de caveolin-1 et 2 (Damm et al., 2005), une mutation dans la protéine p53 (Y220C) (Hsu et al., 1993) et d'autres modifications métaboliques (Buck, 2008). De plus, parmi 25 lignées hépatocytaires testées, les Huh7 expriment le plus haut niveau d' $\alpha$ -fétoprotéine, une glycoprotéine multifonctionnelle, jouant à la fois un rôle de régulateur de croissance et d'apoptose, ce qui en fait un marqueur-clé d'hépatocarcinome et donc de dé-différentiation (Yokoo et al., 2004). Par

conséquent, l'étude de ces aspects fonctionnels dans le cadre d'une infection avec le VHC se voit biaisée de façon significative (Durantel et Zoulim, 2007).

Pourtant, étant donnée la difficulté d'obtenir et de maintenir en culture des hépatocytes primaires humains purifiés et donc isolés de l'ensemble des autres types cellulaires retrouvés dans le tissu hépatique, la majorité des études utilisent des lignées hépatocytaires pour mimer par exemple une interaction entre un pathogène hépatotropique et sa cellule hôte. Cependant, si ces lignées hépatocytaires peuvent être utiles, leur éventail de réponses immunitaires est assez restreint. En effet, si Preiss et al. ont démontré qu'à l'exception du TLR8, les ARNm codant pour les TLRs sont généralement exprimés dans les Huh7, HepG2 et PH5CH8, lignées hépatocytaires les plus utilisées, la fonctionnalité de ces voies n'est pas nécessairement conservée (Preiss et al., 2008). Ainsi, le TLR5 n'est pas détectable dans les HepG2, les ARNm codant pour les TLR4 et 7 ne le sont pas dans les PH5CH8 et les Huh7 ont un défaut dans la voie de signalisation médiée par le TLR3, l'expression de ce dernier y étant réduite ou absente. Les HepG2 et les Huh7 ne répondent qu'à l'ARN intracellulaire (Li et al., 2005a; Preiss et al., 2008), la voie TLR3 n'y étant pas fonctionnelle. Les Huh7.5, un sous-clone de Huh7 reconnu pour être particulièrement permissif au VHC, sont défectueuses dans la voie de signalisation médiée par RIG-I à cause d'une mutation dans ce récepteur (Sumpter et al., 2005). Notons également que le LPS, ligand du TLR4, la loxoribine, celui du TLR7, et l'ADN-CpG, celui du TLR9, n'engendrent aucune réponse dans ces lignées, probablement dû soit à une trop faible expression des ARNm ou des protéines pour ces TLRs dans ces cellules, à moins que la réponse engendrée soit trop faible pour y être détectée (Preiss et al., 2008).

Tel que précédemment établi par Li et al., la lignée hépatocytaire humaine des PH5CH8 immortalisée avec l'antigène large T du virus simien 40 (SV40), représente la seule lignée hépatocytaire apte à répondre à la fois à de l'ARN extracellulaire via le TLR3 et à de l'ARN intracellulaire via RIG-I (Li et al., 2005a).

### **3.2 Reconnaissance du VHC par l'hôte**

Le VHC étant un virus à ARNs, on retrouve au cours du cycle viral à la fois de l'ARNs mais aussi de l'ARNdb généré lors de l'étape de la réplication virale. Le VHC est donc susceptible d'être détecté par différents PRRs (membres de la famille des TLRs, comme le TLR3 ou le TLR7, ainsi que par des récepteurs de la famille des RLHs). Bien que le rôle exact de ces récepteurs dans

la reconnaissance du VHC soit encore l'objet de débats, certains aspects de la reconnaissance du VHC par l'organisme se sont cependant éclaircis.

### **3.2.1 Le VHC et les TLRs**

#### **3.2.1.1 Le TLR3**

TLR3 est un récepteur à ARNdb localisé soit en surface ou au niveau de compartiments intracellulaires (endosomes). Au cours d'une infection avec le VHC, l'ARN viral peut être rencontré dans l'espace extracellulaire suite à une lyse des cellules infectées, ce qui rend envisageable une reconnaissance par le TLR3. Très récemment, Wang et al. ont démontré que le VHC pouvait être reconnu par le TLR3 dans des cellules Huh7 exprimant le récepteur de façon ectopique. La détection du VHC y entraînait une réponse antivirale caractérisée par une activation d'IRF3 ainsi qu'une induction des ISGs, limitant ainsi la réplication du VHC (Wang et al., 2009). Par ailleurs, des expériences de mutagenèse au niveau du site de reconnaissance du ligand sur le TLR3 ont aboli la synthèse des ISGs. De plus, l'expression des ISGs a été confirmée dans des Huh7.5 dépourvues de RIG-I mais transfectés avec le vecteur d'expression du TLR3: il s'agit donc bien d'un processus spécifique à ce récepteur indépendant de RIG-I. Le PAMP exact du VHC à l'origine de la stimulation du TLR3 reste cependant encore à définir.

D'autres études ont démontré l'interférence par le VHC de la voie médiée par le TLR3, en particulier par le clivage de TRIF, son adaptateur-clé. En effet, TRIF, comme nous le verrons plus loin, partage une homologie en acides aminés (Ser-Thr-Pro-Cys-Ser) avec le site de clivage de NS3/4A situé entre NS4B et NS5A (Ferreon et al., 2005; Li et al., 2005c). La subversion de la voie de signalisation médiée par TRIF a également été démontrée dans d'autres types cellulaires. Rodrigue-Gervais et al. ont en effet démontré que suite à une stimulation des TLR3 et TLR4, une corrélation négative était obtenue entre la production d'IL12 et de TNF $\alpha$  dans les DCs circulantes provenant de patients chroniquement infectés avec le VHC et la quantité d'ARN viral retrouvé dans ces mêmes cellules. Cette perte de fonction associée au VHC et impliquant le TLR3 témoignerait donc d'une participation du TLR3 dans la reconnaissance du VHC (Rodrigue-Gervais et al., 2007).

#### **3.2.1.2 Le TLR7**

Les TLRs7/8 sont aptes à reconnaître des virus à ARNsb et à activer des réponses antivirales comme c'est le cas au cours de l'infection avec le virus de l'influenza qui induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN $\alpha$  via le TLR7 (Diebold et al., 2004). Une haute

concentration d'ARNsb ou encore de son produit de dégradation, comme c'est le cas au cours des infections avec le VIH, le RSV ou encore avec le FMDV (foot and mouth disease virus), sont également détectés par les TLR7/8 (Diebold et al., 2004; Guzylack-Piriou et al., 2006; Heil et al., 2004; Hornung et al., 2004; Lund et al., 2003; Lund et al., 2004; Zhang et al., 2008c).

La reconnaissance du VHC par le TLR7 fut suggérée lorsqu'un traitement consistant en une injection intraveineuse d'isatoribine, un agoniste du TLR7, a permis de réduire considérablement les concentrations d'ARN viral plasmatiques chez des patients chroniquement infectés avec le VHC (Horsmans et al., 2005). Lee et al. ont démontré quant à eux que le TLR7 pouvait médier la réponse antivirale au VHC de façon dépendante et indépendante à l'IFN (Lee et al., 2006b). L'étude de Schott et al. a démontré la prévalence du polymorphisme d'un nucléotide (SNP) du TLR7 chez des patients chroniquement infectés avec le VHC. Par ailleurs, la présence de ce SNP aurait un effet significatif sur la progression de la maladie vers la fibrose (Schott et al., 2007). L'hypothèse d'une diminution de la stabilité de l'ARNm codant pour TLR7 en présence du VHC a également été avancée comme un mécanisme de subversion de l'immunité innée.

Une autre étude propose qu'au cours de l'internalisation et de l'endocytose du VHC par des pDCs, la voie de signalisation médiée par le TLR9 serait bloquée par un mécanisme d'interférence par le VHC résultant en une diminution de synthèse d'IFN $\alpha$  dans les cellules infectées. De plus, cette interaction entre VHC et TLR9 jouerait un rôle de ségrégation de l'ARN viral qui ne serait alors plus disponible pour le TLR7 (Gondois-Rey et al., 2009). Cette étude fait suite à deux autres démontrant qu'en présence du JFH1, il y aurait blocage du TLR9 et de la synthèse d'IFN de type I (Decalf et al., 2007; Shiina et Rehmann, 2008). Decalf et al. démontrèrent en effet l'existence dans les pDCs d'un mécanisme de reconnaissance du VHC indépendant de l'ARNdb et qui mènerait à la production de quantité importante d'IFN de type I. De plus, l'expression des TLRs dans les pDCs étant limitée aux TLR7 et 9 (Iwasaki et Medzhitov, 2004), la reconnaissance de l'ARNsb par le TLR7 dans les pDCs pourrait être une voie de détection antivirale importante. Zhang et al. ont aussi démontré que suite à l'attachement d'un virion en surface puis à son endocytose, l'ARN du VHC, par ses séquences riches en G/U à l'extrémité 3'-terminale pourrait induire une activation de la réponse antivirale par le TLR7 dans des PBMCs, des pDCs, des THP-1 et des Huh7 (Zhang et al., 2009).

### 3.2.2 Le VHC et RIG-I

Si la reconnaissance de l'ARNsb du VHC par les TLR7 et TLR8 était envisageable au niveau des endosomes, il est plus difficile d'envisager que ces TLRs soient impliqués dans la détection du virus initiant un cycle répliatif dans le cytosol : c'est alors que la reconnaissance par les récepteurs intracellulaires pourrait être envisagée. Nous savons que le VHC se réplique en association avec les membranes cellulaires et qu'il induit la formation de structures membranaires dans lesquelles les complexes de répliation se retrouvent compartimentalisés et par le fait même, protégés des récepteurs à ARN de l'hôte (Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003). Ceci n'exclut cependant pas la présence d'ARN viral dans le cytoplasme. En effet, l'existence de petits complexes de répliation en dehors des larges complexes péripérinucléaires a déjà été démontrée tôt dans l'infection (moins de 24 hrs) (Targett-Adams et al., 2008; Wolk et al., 2008). Ceux-ci pourraient constituer des occasions précoces de détection du VHC par la cellule-hôte.

Comme nous l'avons décrit plus haut, les ARNdb portant un motif tri-phosphate au niveau de leur extrémité 5', les ARNdb courts et les séquences d'ARN portant des régions riches en uridines et adénosines sont potentiellement reconnus par le récepteur intracytoplasmique RIG-I (Hornung et al., 2006; Kato et al., 2008; Pichlmair et al., 2006; Saito et al., 2008; Takahasi et al., 2008; Uzri et Gehrke, 2009). Récemment, il fut clairement démontré que les PAMPs localisés dans la région 3' du génome du VHC provenant de trois différentes souches (Con1, J4L6, JFH1) activent la voie de signalisation médiée par RIG-I. Cela dit, si la région polyU/UC est un puissant activateur de RIG-I, elle ne suffit pas à elle seule pour cette activation: l'extrémité 5'PPP est en effet également nécessaire pour l'activation de RIG-I (Saito et al., 2008; Uzri et Gehrke, 2009).

Comment RIG-I pourrait-il reconnaître deux motifs distincts séparés par 9600 paires de bases? Il est possible qu'il existe des interactions entre les régions 5' et 3' du génome du VHC pour faciliter la traduction et qui permettraient d'activer RIG-I (Ito et al., 1998; Song et al., 2006). Une alternative serait que la reconnaissance par RIG-I se fasse de façon séquentielle, la reconnaissance de la région polyU/UC ne requérant pas immédiatement celle de la région 5'PPP (Uzri et Gehrke, 2009). En effet, des études structurales ont suggéré que RIG-I avait deux domaines distincts de reconnaissance et d'attachement à l'ARN (Cui et al., 2008; Takahasi et al., 2008). Ainsi, RIG-I pourrait reconnaître l'ARNsb 5'PPP via un site chargé positivement au niveau de son extrémité C-terminale. Ce site de reconnaissance ne pouvant recevoir que 3 nucléotides, RIG-I utiliserait un domaine additionnel, probablement via sa portion hélicase afin de discriminer d'autres séquences spécifiques, comme le motif polyU/UC. Dans ce cas, la séquence intermédiaire de répliation du



polyU/UC, c'est-à-dire la séquence polyA/AG pourrait également activer RIG-I. Ainsi, au cours de la réplication, le motif 5'PPP du brin négatif du VHC serait à proximité de la région polyA/AG et ces motifs pourraient être reconnus par RIG-I. Il a aussi été proposé que RIG-I puisse s'attacher à son ligand d'ARN et le parcourir en scannant toute la séquence (Myong et al., 2009).

### **3.3 Les virus et la subversion de l'immunité innée**

La subversion des mécanismes de l'immunité innée permet à de nombreux virus de contourner ou d'inhiber directement la réponse antivirale en ciblant différents interacteurs des voies de signalisation induites suite à la reconnaissance du pathogène viral. Nous ferons donc un bref survol des mécanismes d'interférence utilisés par différents virus avant de voir plus en détail ceux mis en place par le VHC.

#### **3.3.1 Quelques exemples de mécanismes d'interférence virale**

##### **3.3.1.1 Au niveau de l'étape de reconnaissance du virus par la cellule-hôte**

Certains virus contournent les défenses de l'hôte en dissimulant leurs PAMPs génomiques. Ainsi, les Poxvirus et les Rotavirus utilisent la même machinerie que l'hôte pour la synthèse de leur ARN, ce qui leur permet d'avoir une coiffe à l'extrémité 5' de leur génome comme les ARNm de leur hôte. Le virus de la maladie de Borna (Borna Disease Virus) exprime une phosphatase lui permettant de convertir un triphosphate en un monophosphate, ce qui lui évite de porter le motif 5'PPP, un PAMP reconnu par l'hôte (Habjan et al., 2008), alors que les Picornavirus protègent les extrémités 5' non coiffées de leur génome grâce à une protéine liée de façon covalente (Flanegan et al., 1977; Lee et al., 1977). D'autres virus codent pour des protéines destinées à former des complexes avec l'ARN viral, afin que ce dernier ne soit plus disponible pour les RLRs de l'hôte, comme la protéine E3L du VACV, la VP35 du virus Ébola, et la protéine Tat du VIH (Haasnoot et al., 2007; Weeks et al., 1990).

##### **3.3.1.2 Au niveau des récepteurs ou de leurs adaptateurs**

D'autres virus visent directement les PRRs ou leur adaptateur-clé en bloquant leur activité. Ainsi, la protéine NS1 du virus de l'influenza A s'attache au complexe RIG-I et CARDIF et bloque la voie de signalisation (Mibayashi et al., 2007), alors que la protéine V des Paramyxovirus interagit avec MDA5 (Andrejeva et al., 2004). Le Poliovirus induit pour sa part le clivage de MDA5 par les caspases (Barral et al., 2007). CARDIF, l'adaptateur-clé de la voie médiée par RIG-I est ciblé par

l'activité protéolytique de la protéase précurseur 3ABC du virus de l'hépatite A (Yang et al., 2007) ou encore par la protéase NS3/4A du VHC. La protéine A52R du VACV interfère avec la voie de signalisation du TLR3 en inhibant l'activation de NFκB suite à la séquestration de TRAF6 et IRAK2 (Harte et al., 2003), alors que la protéine A46R du même virus inhibe à la fois l'activation de NFκB et d'IRF3 par son interaction avec TRIF ainsi qu'avec d'autres protéines adaptatrices. En effet, la protéine A46R contient un domaine TIR, ce qui lui permet d'interagir avec les complexes contenant un domaine TIR, comme MyD88, MAL, TRIF et TRAM. Il lui est donc possible d'inhiber l'activation de NFκB et des IRFs suite à la détection du virus par un TLR (Stack et al., 2005).

Au lieu de bloquer les voies de reconnaissance antivirale, certains virus utilisent et manipulent ces voies de signalisation afin de créer un environnement favorisant la réplication virale dans la cellule hôte. Ainsi, la protéine DDX3 est utilisée par le VHC pour sa réplication (Ariumi et al., 2007) ou encore par le VIH-1 comme une protéine navette afin de transporter les ARNm viraux en dehors du noyau de la cellule hôte (Yedavalli et al., 2004). Des études sur des souris déficientes en TLR3 ont démontré que suite à des infections avec le WNV, le virus de l'influenza A ou encore le VACV, l'absence de TLR3 pouvait favoriser l'hôte dans la mesure où ces virus utiliseraient l'inflammation médiée par le TLR3 afin de se disséminer et d'établir une infection (Hutchens et al., 2008; Le Goffic et al., 2006; Wang et al., 2004a). Ainsi, la production de cytokines pro-inflammatoires médiée par le TLR3 permettrait d'augmenter la perméabilité de la barrière encéphalique facilitant ainsi l'entrée du virus au cerveau (Wang et al., 2004a).

### **3.3.1.3 Au niveau des kinases comme TBK-1**

Que ce soit via les TLRs ou les RLRs, l'activation des voies de signalisation antivirales mène à l'activation des kinases TBK-1 et IKKε permettant la phosphorylation, la dimérisation et la migration au noyau d'IRF3 et IRF7. Les protéines virales comme la NS3 du VHC ou la N1L du VACV peuvent interagir avec TBK-1 inhibant ainsi la suite de la voie de signalisation (DiPerna et al., 2004; Otsuka et al., 2005). TBK-1 peut également être inhibée par une phosphoprotéine dans de nombreuses infections avec des virus à ARN négatif comme le virus de la Rage ou le BDV (Brzozka et al., 2005; Unterstab et al., 2005). Dans des cellules possédant un TBK-1 inactif, IRF3 n'est pas phosphorylé et ne peut donc pas transloquer au noyau (Alff et al., 2008; Unterstab et al., 2005). La protéine G1 de l'Hantavirus pathogène peut, quant à elle, inhiber la fonction de TBK-1 en détruisant les interactions TRAF3-TBK-1 requises pour la signalisation (Alff et al., 2008). Une autre protéine virale, la K7R du virus du VACV peut, par sa capacité à lier DDX3, empêcher

l'activation des IRFs par TBK-1 et IKK $\epsilon$ , ce qui démontra d'ailleurs pour la première fois qu'une hélicase de type DEAD-box pouvait être impliquée dans l'activation des IRFs par TBK-1 et IKK $\epsilon$  (Schroder et al., 2008; Soulat et al., 2008).

#### **3.3.1.4 Au niveau des IRFs**

Des mécanismes de compétition avec le facteur de transcription IRF3 ont été démontrés dans le cas d'infections avec des Paramyxovirus. Certaines protéines virales ont en effet la capacité de mimer IRF3 et donc de compétitionner pour son activation par TBK-1 et IKK $\epsilon$  (Lu et al., 2008). L'Herpesvirus 8 humain exprime aussi plusieurs homologues des IRFs agissant ainsi comme des inhibiteurs dominant négatifs en prévenant l'association d'IRF3 avec ses co-activateurs CBP et p300 (Lin et al., 2001). D'autres protéines virales comme l'ICP0 (Infected Cell Protein 0) du HSV s'attachent à IRF3 et le séquestrent avec CPB et p300 dans des vésicules nucléaires (Melroe et al., 2007), alors que l'ICP0 du virus de l'Herpes bovin cause la dégradation d'IRF3 plutôt que sa séquestration (Saira et al., 2007). Ainsi, la dégradation d'IRF3 est un mécanisme courant d'évasion virale, mécanisme potentiellement contourné par l'hôte via ISG15, qui se lie à IRF3 de façon covalente et prévient ainsi sa dégradation par ubiquitination au cours de l'infection par le virus de Newcastle par exemple (Lu et al., 2006). Il a aussi récemment été démontré que la protéine E3L du VACV interagissait avec ISG15, empêchant ainsi sa fonction (Guerra et al., 2008).

Certains virus produisent une protéine qui va directement s'attacher et prévenir la capacité de transactivation d'IRF3 ou IRF7, comme l'oncoprotéine E6 du virus du papillome (Ronco et al., 1998), la protéine NSP1 du Rotavirus (Graff et al., 2002) et la protéine RTA de l'Herpesvirus (Yu et al., 2005). D'autres virus produisent des protéines aptes à interagir avec CBP et p300 et à altérer ainsi leur interaction avec les IRFs comme la protéine vIRF1 de l'Herpesvirus 8 (Lin et al., 2001).

#### **3.3.1.5 Au niveau de NF $\kappa$ B**

Bien qu'NF $\kappa$ B soit impliqué dans la synthèse de nombreux gènes antiviraux comme les ISGs et les chemokines, il a aussi la capacité d'inhiber l'apoptose et de promouvoir la prolifération cellulaire, avantage majeur pour le virus. Certains virus activent donc NF $\kappa$ B afin de prévenir l'induction de mécanismes apoptotiques (Hiscott et al., 2006). Il a même été démontré qu'un mécanisme de régulation biphasique de NF $\kappa$ B était possible par l'ASFV, dont la protéine A238L est un homologue d'I $\kappa$ B résistante à la dégradation qui empêche ainsi la libération d'un NF $\kappa$ B actif en début d'infection (Tait et al., 2000). Plus tard dans l'infection, la protéine A224L permettra d'activer NF $\kappa$ B et d'inhiber les caspases (Rodriguez et al., 2002). La régulation de NF $\kappa$ B peut aussi

être ciblée par l'inhibition des IKKs, comme B14R qui interagit spécifiquement avec IKK $\beta$  et empêche son activation en inhibant sa phosphorylation (Graham et al., 2008).

### **3.3.1.6 Au niveau du type de réponse induite**

D'autres mécanismes de subversion ont également été identifiés, comme la manipulation de la réponse induite par le virus de façon à orienter la réponse immunitaire vers la production d'IL10, cytokine souvent requise pour la persistance virale (Brooks et al., 2006; Ejrnaes et al., 2006).

## **3.3.2 Rôle majeur de NS3/4A dans la subversion de l'immunité innée par le VHC**

Comme nous l'avons précédemment mentionné, le rôle de la protéase virale NS3/4A ne se limite pas qu'au clivage de la polyprotéine précurseur, mais permet également d'interférer efficacement avec la réponse antivirale de l'hôte. En fait, un pas majeur a été franchi dans la compréhension des mécanismes d'interférence par le VHC lorsqu'en 2003, Foy et al. ont clairement montré que l'expression de la protéase NS3/4A dans une cellule infectée avec le virus de Sendai menait au blocage de la migration d'IRF3 au noyau (Foy et al., 2003). Par ailleurs, un agent thérapeutique ciblant NS3/4A permettait de rétablir la fonctionnalité de la voie de signalisation et la localisation nucléaire d'IRF3 apte alors à induire une réponse antivirale dans les cellules infectées. De nombreuses études ont par la suite confirmé que la protéase NS3/4A pouvait bloquer l'induction d'IFN $\beta$  en inhibant la translocation nucléaire d'IRF3 dans les Huh7 arborant un réplikon du VHC ou le JFH1 (Foy et al., 2003; Li et al., 2005b; Li et al., 2005c; Lin et al., 2006b; Loo et al., 2006; Meylan et al., 2005).

Le rôle et les cibles de la protéase du VHC au niveau des voies de signalisation antivirales ont été décrits ces dernières années. Comme nous allons en discuter plus bas, si le blocage de la voie médiée par le TLR3 est encore une source de débat, celui de la voie dépendante de RIG-I est beaucoup plus clairement établi. Cette observation a d'ailleurs mené à l'hypothèse que la voie de détection de l'ARN intracellulaire médiée par RIG-I serait la principale responsable de la détection du VHC par l'hépatocyte dans la mesure où c'est aussi la voie la plus clairement interférée par le virus. Ainsi, comme nous allons le voir plus bas, le clivage de CARDIF par NS3/4A permet en fait au VHC de bloquer l'ensemble de la voie de signalisation en aval de CARDIF, conduisant ainsi au blocage d'une voie antivirale majeure de la cellule.

### 3.3.2.1 Clivage de TRIF par NS3/4A

Les hépatocytes expriment le TLR3 qui suite à la reconnaissance d'un pathogène pourra enclencher une cascade d'évènements menant à la synthèse des IFNs de type I, mais aussi à celle de gènes pro-inflammatoires. Une première étude a proposé une implication du TLR3 dans la reconnaissance du VHC par l'existence d'un site potentiel de clivage par NS3/4A au niveau de l'adaptateur TRIF. Li et al. ont par la suite démontré le clivage de TRIF en Cys-372 *in vitro* par NS3/4A, la position de clivage ayant été trouvée par déduction suite à la découverte d'une séquence similaire au site de clivage de NS4B/NS5A de la polyprotéine du VHC. Le clivage de TRIF a pu être démontré *in vitro* en présence d'une MB-scNS3 (Maltose-Binding single chain NS3) qui n'a d'ailleurs pas causé la protéolyse de TBK-1, IKK $\epsilon$  ou encore de TLR3. De plus, des quantités de MB-scNS3 similaires étaient requises pour la protéolyse *in vitro* de TRIF ou d'un substrat de NS5A/B viral, impliquant donc que cette protéolyse de TRIF par NS3/4A était bien envisageable *in vivo*. Cependant *in vivo*, si l'abondance de TRIF-Flag dans des HEK293 était considérablement réduite en présence de NS3/4A et restaurée en présence de SCH6, un inhibiteur de NS3/4A, aucun produit de digestion de TRIF n'a pu être détecté comme cela avait été le cas *in vitro*. Des expériences de marquage pulsé ont par la suite démontré que l'absence de produit de dégradation de TRIF pouvait être causée par la stabilité réduite des fragments clivés (Li et al., 2005b).

Par ailleurs, Li et al. ont démontré que l'expression de la NS3/4A compromettait sévèrement la cascade de signalisation du TLR3. En effet, dans des cellules stimulées avec du poly(I :C) extracellulaire, l'expression de NS3/4A supprimait l'activation du promoteur de l'IFN $\beta$  et ralentissait considérablement l'expression des protéines ISG15 et ISG56. De plus, l'activation du promoteur de l'IFN $\beta$  était partiellement rétablie en présence de l'inhibiteur de protéase SCH6. Il semblerait donc y avoir un phénomène d'interférence par NS3/4A partiellement dépendant de son activité protéolytique. En parallèle, une réduction de l'abondance de TRIF exprimé de façon ectopique, mais pas de myc-TRIF-C372R, muté au site de clivage a été obtenue dans des cellules d'ostéosarcome exprimant la NS3/4A de façon conditionnelle (UNS3-4A-24). Il a également été démontré que l'activation d'IRF3 par du poly(I :C) extracellulaire était inhibée dans des HeLa en présence du réplicon du VHC et que la quantité de TRIF endogène y était significativement réduite (Li et al., 2005b).

Les résultats d'autres études portant sur le clivage de TRIF par NS3/4A vont cependant à l'encontre des précédentes. En effet, Li et al. ont rapporté que dans des PH5CH8, qui possèdent une voie TLR3 endogène fonctionnelle, seule la voie médiée par RIG-I est interférée en présence de la protéase NS3/4A exprimée ectopiquement (Li et al., 2005a). Dans des HeLa, ni clivage, ni

diminution de TRIF n'ont été obtenus en présence de NS3/4A par les mêmes auteurs. Plus récemment, une autre étude a démontré qu'après stimulation du TLR3 suite à l'ajout d'ARNdb extracellulaire, ni la transcription d'IFN $\beta$ , ni l'activation de NF $\kappa$ B n'étaient affectées par l'expression de différentes protéases NS3/4A provenant de 15 patients infectés avec le VHC de génotype 1b ou 2a. Ces différentes protéases NS3/4A étaient pourtant fonctionnelles puisque aptes à cliver un substrat NS5A-NS5B ainsi que l'adaptateur CARDIF (Dansako et al., 2009).

### 3.3.2.2 Clivage de CARDIF par NS3/4A

Il a été démontré que des Huh7 infectées avec le JFH-1 étaient incapables d'induire la synthèse d'IFN $\beta$  suite à une surexpression de CARDIF, défaut pouvant être totalement réparé suite à l'ajout d'un inhibiteur spécifique de NS3/4A (Loo et al., 2006). Ceci implique donc qu'un mécanisme d'interférence a bien lieu au niveau de CARDIF, comme ce fut également démontré dans des cellules en présence du réplicon du VHC de génotype 1 (Li et al., 2005c). Notons néanmoins que Cheng et al., révélèrent une réparation partielle de l'induction de l'IFN $\beta$  dans des Huh7 infectées avec le JFH-1 suite à la stimulation par de l'ARNdb intracellulaire (et non une surexpression de CARDIF comme précédemment) (Cheng et al., 2006). Ceci suggérerait donc l'existence d'un mécanisme NS3-indépendant additionnel qui interférerait avec la production d'IFN $\beta$ . L'observation parallèle qu'une surexpression de RIG-I permettrait de rétablir la fonctionnalité de la voie suggère la possibilité d'une voie indépendante de CARDIF mais toujours médiée par RIG-I. Il est intéressant de mentionner l'étude d'Otsuka et al., qui met en lumière une activité protéolytique indépendante de NS3/4A sur TBK-1. En effet, le domaine hélicase de NS3 serait responsable d'une interaction directe avec TBK-1, empêchant la kinase d'activer IRF3 (Otsuka et al., 2005).

Le clivage de CARDIF par NS3/4A engendre sa délocalisation de la membrane mitochondriale, ce qui abolit l'activation de la voie de signalisation médiée par RIG-I et donc empêche l'induction des gènes antiviraux (Foy et al., 2005; Li et al., 2005b; Loo et al., 2006; Meylan et al., 2005). Baril et al. ont récemment démontré le blocage de l'oligomérisation de CARDIF due à l'activité protéolytique de NS3/4A et donc l'absence de signalisation en aval. Par ailleurs, l'oligomérisation de CARDIF et non sa localisation membranaire serait essentielle à l'activation de la voie de signalisation en aval (Baril et al., 2008; Tang et Wang, 2009).

### 3.3.3 Autres mécanismes de subversion de l'immunité innée par le VHC

La plupart des protéines du VHC interagissent avec la cellule-hôte afin de favoriser le cycle viral et de limiter la réponse antivirale (**Fig. 24**). Nous avons décrit celles concernant NS3/4A et des protéines-clé de la cellule-hôte impliquées dans la reconnaissance du VHC et l'activation des voies de signalisation menant à une réponse antivirale. Dans la section qui suit, nous ferons un bref survol de quelques autres interactions connues entre les protéines du VHC et celle de l'hôte.

En plus de bloquer certaines voies de signalisation menant à la synthèse des IFNs, les protéines du VHC ont aussi la capacité de bloquer l'activité de certaines molécules antivirales de l'hôte, dont plusieurs ISGs. La protéine Core du VHC interfère avec la voie de signalisation classique de l'IFN en interagissant avec STAT et contribue ainsi à une résistance à la fois à l'IFN endogène mais aussi exogène. En effet, il a été démontré que dans des Huh7 transfectées avec Core, une diminution de l'accumulation de la protéine STAT1 est observée, de même qu'une augmentation de sa dégradation de façon protéasome-dépendante (Lin et al., 2005; Lin et al., 2006c). Par ailleurs, Core exprimée seule peut bloquer la voie de signalisation Jak/STAT. Des études structurales et fonctionnelles ont démontré qu'une région à l'extrémité N-terminale de Core s'attache directement au site SH2 de STAT1 empêchant par la suite son recrutement et sa phosphorylation par Jak1 ainsi que la subséquente activation des ISGs (**Fig. 24**) (de Lucas et al., 2005; Lin et al., 2006c; Melen et al., 2004). De plus, Core induit l'expression de SOCS3, régulateur négatif de la voie de signalisation Jak/STAT, résultant en une diminution de la phosphorylation de STAT1 par Jak1 en réponse à l'IFN de type I (Bode et al., 2003). Finalement, il a également été démontré que Core induisait la protéine PP2A, qui, en induisant d'autres molécules inhibitrices, réduit significativement l'activité transcriptionnelle du complexe ISGF3 (Heim et al., 1999). Core interagit également avec la protéine DDX3, membre de la famille des hélicases à domaine « DEAD box » (Mamiya et Worman, 1999; Owsianka et Patel, 1999; You et al., 1999). Il a récemment été démontré qu'au cours d'une infection virale, DDX3 interagit avec IKK $\epsilon$  afin de prévenir l'activation d'IRF3 (Schroder et al., 2008). Des études plus approfondies sont toutefois requises pour déterminer si l'interaction entre Core et DDX3 est requise pour la réplication virale (Ariumi et al., 2007) et si elle a un effet sur l'activation d'IRF3 au cours de l'infection virale.

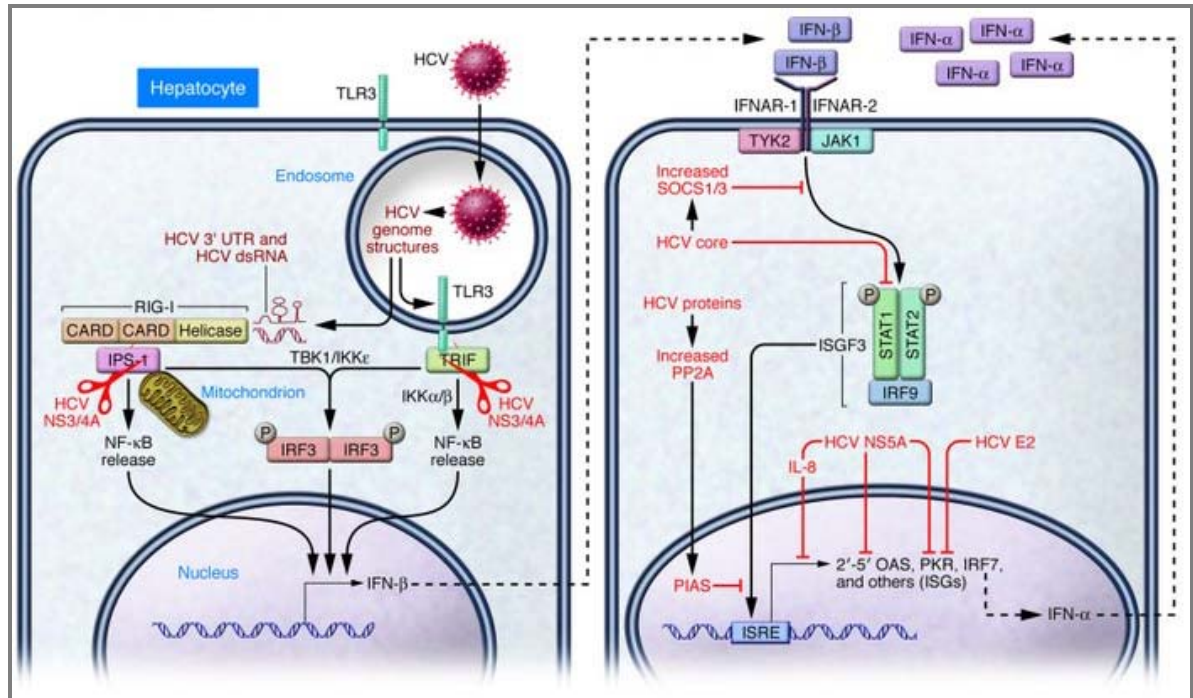
D'autre part, Core induirait un stress oxydatif ainsi que l'expression de gènes antioxydants (Okuda et al., 2002), ce qui aurait un impact sur la régulation de l'apoptose dans les cellules infectées, et donc sur la pathogenèse.

NS5A, qui est impliquée dans la réplication du VHC et dans l'assemblage de la particule virale (Appel et al., 2008; Huang et al., 2007c; Tellinghuisen et al., 2008) prévient l'activation de PKR en s'attachant au site catalytique de cette dernière bloquant ainsi sa fonction de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (**Fig. 24**). NS5A interfère alors avec le rôle d'inhibiteur de la traduction de PKR, ce qui résulte en une augmentation de la réplication du VHC (Gale et al., 1998; Pflugheber et al., 2002). Mentionnons cependant que des résultats contradictoires furent obtenus à ce sujet (Francois et al., 2000). Il fut également démontré que NS5A pouvait interférer avec la fonction antivirale de la 2'-5'OAS via une interaction directe avec cette dernière (Taguchi et al., 2004). L'expression de NS5A semble aussi induire la sécrétion d'IL-8, ce qui résulte en une diminution de la synthèse d'ISGs. Par sa capacité à s'attacher à MyD88, NS5A aurait également la capacité de prévenir la signalisation via la voie des TLRs (Abe et al., 2007).

Finalement, une fraction cytosolique soluble de la glycoprotéine E2 pourrait agir comme compétiteur avec eIF2 $\alpha$  pour PKR, ce qui réduirait l'activité kinase de PKR (**Fig. 24**) (Taylor et al., 1999).

Ainsi, le VHC interfère à trois niveaux au cours de la réponse antivirale: tout d'abord dans les voies de signalisation impliquées lors de la détection du virus, puis au niveau de la voie classique des IFNs, et finalement au niveau de la fonction de certains ISGs.





**Figure 24:** Atténuation de la réponse immunitaire innée par le VHC

L'ARN viral est détecté par RIG-I et TLR3. Ces récepteurs activent CARDIF et TRIF ce qui mène ultimement à l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NFκB engendrant la transcription de gènes antiviraux-clé comme l'IFNβ. NS3/4A a la capacité de cliver CARDIF et TRIF (*in vitro*). L'attachement des IFNs de type I à leur récepteur engendre l'activation de la voie classique des IFNs par JAK/STAT, qui aboutit à la formation du facteur ISGF3 apte à reconnaître les séquences ISRE situées dans les promoteurs des ISGs. La protéine Core du VHC interfère avec la voie JAK/STAT en induisant SOCS1/3 et en inhibant la phosphorylation de STAT1. La polyprotéine du VHC induit la phosphatase PP2A (Protein Phosphatase 2A), qui interfère avec la méthylation de STAT1, ce qui augmente l'attachement de STAT1 à son inhibiteur, PIAS. L'interaction entre STAT1/PIAS empêche l'attachement d'ISGF3 aux ISREs, et bloque donc la transcription des ISGs. Les protéines E2 et NS5A inhibent quant à elles la fonction de plusieurs ISGs. Figure tirée de (Rehermann, 2009).

### 3.4 Étude de la réponse antivirale dans différents modèles d'infection avec le VHC

NS3/4A du VHC joue un rôle-clé dans la subversion de l'immunité innée en bloquant au moins une des voies majeures de signalisation activée suite à la reconnaissance de l'ARN viral. D'autres protéines virales participent également à l'interférence en interagissant avec des molécules-clé des voies de signalisation ainsi qu'avec des effecteurs antiviraux essentiels. Dans la section qui suit, nous nous intéresserons aux différentes réponses antivirales observées suite à une infection avec le VHC dans différents modèles *in vitro* puis *in vivo*, à savoir dans des lignées hépatocytaires Huh7 supportant la réplication virale, dans des hépatocytes primaires humains, des hépatocytes primaires humains fœtaux, dans le modèle de souris chimérique SCID-Alb/uPA, chez

le chimpanzé et finalement dans des biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC.

### 3.4.1 Réponse antivirale au VHC dans les lignées hépatocytaires Huh7

#### 3.4.1.1 Modèle d'infection

L'infection de cellules Huh7 avec le JFH1 à une haute MOI n'aboutit pas à l'induction d'IFN $\beta$  ou d'ISGs lorsqu'elle est conduite sur une cinétique de 48 hrs avec plus de 90% de cellules infectées (Cheng et al., 2006). De plus, aucune translocation nucléaire d'IRF3 n'est observée, indiquant donc une absence d'activation des voies de signalisation antivirales en dépit de la présence du JFH1 dans ces cellules. Pourtant, en absence du JFH1, le poly(I:C) transfecté induit normalement la synthèse d'IFN $\beta$  et d'ISGs, indiquant donc que la voie de détection de l'ARN cytosolique est bien fonctionnelle dans ces cellules et donc que le VHC interfère spécifiquement avec cette voie, le TLR3 n'étant pas exprimé dans cette lignée. À la vue de ces résultats, deux options sont envisageables : soit le VHC interfère de façon active comme par clivage d'un intermédiaire de la voie de signalisation, soit il interfère de façon passive par dissimulation de ses PAMPs. Par ailleurs, lorsque le poly(I:C) est transfecté dans les cellules infectées avec le JFH-1, la réponse antivirale n'est plus induite, ce qui favoriserait plutôt l'hypothèse d'un processus d'interférence actif. Notons également que l'ajout d'IFN recombinant dans les cellules infectées avec le VHC mène à une induction efficace de la voie classique des IFNs, ce qui suggère que cette voie de signalisation médiée par les JAKs-STATs est intacte (Cheng et al., 2006).

Une autre étude démontra pourtant une localisation nucléaire d'IRF3 dans des cellules Huh7.5 infectées avec le JFH-1 à faible MOI, exprimant donc de très faibles quantités de protéines virales comme ce fut également observé, comme nous le verrons plus tard, dans des biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC. Cette observation amena Lau et al. à souligner l'importance de la MOI au cours d'une infection avec le VHC *in vitro* (Lau et al., 2008). En effet, un des biais majeurs des études menées jusqu'ici serait associé au fait que les MOI utilisées dans ces lignées hépatocytaires sont élevées, engendrant des niveaux de protéines virales supérieurs à ceux observés *in vivo*, et donc non physiologiques. L'absence d'une réponse antivirale de l'hôte dans une culture où 90% des cellules sont infectées serait donc un biais. En effet, dans des conditions d'infection à faible MOI, il a été observé qu'après 36 hrs d'infection, une forme nucléaire d'IRF3 est obtenue dans une petite proportion de cellules, en particulier celles exprimant de faibles quantités de protéines virales. Il y aurait en fait une induction initiale d'ISGs suite à la

détection d'ARN viral dans les cellules infectées, et ce, jusqu'à ce que les mécanismes d'interférence viraux soient mis en place, c'est-à-dire lorsque les protéines virales atteignent un niveau d'expression suffisant. Par contre, les cellules exprimant de hauts niveaux de protéines virales ne présentent pas de forme nucléaire d'IRF3. Dans ce système, la faible fréquence d'activation d'IRF3 est associée à l'expression d'ISG15 et 56, indiquant donc que dans le cadre d'une infection à faible MOI, le VHC peut effectivement interférer avec les voies de signalisation antivirales, mais qu'une production d'ISGs y est néanmoins observable comme ce qui est observé comme nous le verrons plus loin, dans des biopsies de foies de patients chroniquement infectés (Lau et al., 2008).

#### **3.4.1.2 Comparaison de la réponse antivirale au VHC dans les Huh7 et dans les biopsies de foie**

En dépit des mécanismes d'interférence virale, les analyses transcriptomiques de matériel provenant de biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC ou de biopsies de chimpanzés ayant développé une infection chronique ont révélé de hauts niveaux d'induction des ISGs, des chémokines et d'autres marqueurs de la réponse antivirale. Ainsi, même si les mécanismes d'interférence virale par le VHC ont clairement été démontrés dans différents modèles, une réponse immunitaire antivirale est observable sans toutefois être suffisante puisque l'infection virale perdure.

Une étude récente a effectué une comparaison entre le transcriptome de la lignée Huh7.5 à 72 hrs après infection avec le VHC et celui de biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC. De nombreux gènes induits se recoupent entre les deux modèles (Walters et al., 2009). Les gènes de la réponse antivirale tels que les ISG15 et 20, ceux codant pour des cytokines pro-inflammatoires, des chémokines (CCL4, CXCL1, IL32, TGF $\beta$ 1,...) ou encore des gènes impliqués dans la signalisation des facteurs de croissance sont significativement induits. Comme nous l'avons vu plus haut, il a été suggéré que le VHC pouvait en fait agir de façon séquentielle au cours de l'infection d'une même cellule. Dans un premier temps, suite à la production des intermédiaires de réplication d'ARNdb et à leur détection par les PAMPs de l'hôte, le VHC pourrait induire les voies de signalisation antivirales aboutissant à l'expression de gènes antiviraux. Plus tard dans l'infection, lorsque le niveau de protéines virales aurait atteint un niveau suffisant, les mécanismes d'interférence virale pourraient être induits, empêchant une élimination efficace du virus dans l'environnement direct du groupe de cellules infectées.

Il a été proposé que la production d'IFN et d'ISGs observée dans les biopsies de foies infectés avec le VHC pouvait résulter de la réponse antivirale provenant de cellules non infectées ou encore d'infiltrats de cellules immunitaires, comme les pDCs ou d'autres cellules nonparenchymateuses particulièrement aptes à produire de hauts niveaux d'IFN (Siegal et al., 1999). Cela dit, la démonstration de la fonctionnalité de la voie de l'IFN classique pourrait expliquer pourquoi des cellules infectées pourraient tout de même être en mesure de répondre à de l'IFN secrété de façon paracrine par d'autres cellules et induire ainsi des ISGs. En effet, une comparaison entre les profils d'expression des Huh7.5 infectées avec le VHC et celui d'Huh7 traitées avec de l'IFN recombinant révèle un profil d'expression génique semblable, confirmant donc une association entre l'infection avec le VHC et l'activation de la voie de signalisation des IFNs de type I (Cheng et al., 2006).

#### **3.4.1.3 Infection avec le VHC et apoptose**

L'étude récente basée sur le transcriptome de la lignée Huh7.5 à 72 hrs après infection avec le VHC a également fait ressortir l'impact de l'infection avec le VHC sur le cycle cellulaire, le stress oxydatif et l'apoptose (Walters et al., 2009). De plus, l'analyse du profil transcriptomique et sa comparaison avec celui de patients chroniquement infectés avec le VHC souligne le rôle majeur de certains des gènes induits dans la progression de la maladie du foie, puisqu'ils seraient particulièrement élevés chez des patients développant une fibrose rapide.

Cette étude transcriptomique permet de souligner clairement que le VHC a des effets cytopathiques par lui-même, et donc que les dommages causés au foie ne sont pas uniquement le produit de l'activité cytotoxique d'infiltrats de cellules immunitaires. Par ailleurs, l'expression différentielle de gènes reliés à la mort cellulaire ainsi que la détection de la caspase-3 clivée dans des cellules infectées avec le VHC indiquent que l'effet cytopathique observé est bien l'apoptose, et qu'il coïncide de surcroît avec des pics de charges virales. Un certain nombre de gènes dérégulés au cours d'une infection avec le VHC *in vitro* sont associés avec la régulation de la progression du cycle cellulaire et de son arrêt ainsi que l'induction de l'apoptose, du stress oxydatif et des dommages causés à l'ADN. La cytotoxicité observée pourrait en fait être reliée à un ralentissement dans la progression du cycle cellulaire. De plus, le phénomène d'apoptose associé avec un arrêt du cycle cellulaire est potentiellement médié par la mitochondrie et la voie de signalisation de p53 (Bates et Vousden, 1996). D'ailleurs, des études d'immunohistochimie ont révélé que dans des biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC, peu d'hépatocytes dépassent la phase G1 du cycle (Marshall et al., 2005). De façon intéressante, cet arrêt en phase G1 est associé à

une augmentation de l'expression de la p21, un inhibiteur de la cycline Cdk causant un arrêt en G1 après un dommage de l'ADN. De plus, une corrélation a été observée entre l'expression de p21 et la sévérité de la fibrose, ce qui renforce la possibilité d'un lien entre un délai dans la progression du cycle cellulaire et des dommages hépatiques (Walters et al., 2009).

### **3.4.2 Réponse antivirale dans des hépatocytes primaires humains fœtaux**

Iacovacci et al. ont démontré qu'il était possible de détecter des formes répliquatives du VHC dans des hépatocytes humains fœtaux exposés à des sérums de patients chroniquement infectés avec le VHC, indiquant donc que ce type cellulaire est bien permissif à ce virus (Iacovacci et al., 1997). Plus récemment, l'étude de Lazaro et al. a démontré que des cultures d'hépatocytes humains fœtaux transfectés avec de l'ARN du VHC présentent des niveaux d'IFN $\beta$  détectables dans le milieu de culture 14 jours suivant la transfection et ce jusqu'à 2 mois plus tard (Lazaro et al., 2007). Par contre, l'IFN $\alpha$  n'a pu être détecté. En parallèle, les niveaux de LDH (Lactate Deshydrogénase), indicateur d'un stress cellulaire, sont particulièrement élevés après 24 jours de transfection, suggérant des effets toxiques dans les cellules. Des anomalies dans la morphologie des hépatocytes ainsi que la présence d'apoptose ont pu être détectées dans les groupes de cellules infectées.

Par ailleurs, un relâchement cyclique de particules virales a été observé et associé avec des mécanismes immunitaires innés comme la synthèse d'agents antiviraux. En effet, des chimpanzés inoculés avec la souche FL-J6/JFH présentent également des pics cycliques de virémie, et ce au cours d'une période allant jusqu'à 16 semaines post-infection. Ces fluctuations sont attribuées à une réponse immunitaire de la part de l'hôte (Lindenbach et al., 2006). Toutefois, dans le cas des hépatocytes humains fœtaux, les corrélations entre les niveaux d'ARN viraux et la production d'IFN $\beta$  dans le milieu de culture n'ont pas donné de corrélation significative (Lazaro et al., 2007).

### **3.4.3 Réponse antivirale dans des hépatocytes primaires humains**

Une autre observation intéressante fut celle obtenue dans des hépatocytes primaires humains infectés avec des sérums de patients chroniquement infectés avec le VHC de génotype 1, 2 ou 3. Des inductions importantes ont été obtenues pour les gènes codant pour l'IL15, l'IFN-R1, IRF3, IRF7, 8, l'ADAR, ou encore l'OASL, 72 hrs après l'infection (Buck, 2008).

L'infection d'hépatocytes primaires humains avec le JFH1 n'a pas encore été rapportée, bien que très attendue. Un certain nombre de difficultés techniques, entre autre l'accessibilité à des cultures d'hépatocytes primaires humains et le succès aléatoire d'une infection avec le JFH1

expliquent ce retard. Cette expérience représenterait pourtant un modèle idéal pour mimer la phase aiguë de l'infection dans la mesure où elle représenterait la première étape d'interaction entre les particules virales du VHC et les hépatocytes et qu'il est quasiment impossible d'obtenir des biopsies de patients en phase aiguë de la maladie.

### **3.4.4 Réponse antivirale dans un modèle de souris chimérique SCID-Alb/uPA**

#### **3.4.4.1 Description du modèle**

Le système Alb/uPA (Albumin/urokinase Plasminogen Activator) permet de générer un foie humain au sein d'une souris, puisqu'il induit une destruction progressive des hépatocytes murins qui sont remplacés par des hépatocytes humains susceptibles d'être infectés avec le VHC. Ce système permet d'obtenir une infection *in vivo* dans des hépatocytes primaires humains à des niveaux biologiques (Hsu et al., 2003; Lindenbach et al., 2006; Mercer et al., 2001; Meuleman et al., 2005; Walters et al., 2006a). Ainsi, de hauts niveaux d'ARN viraux ainsi qu'un relâchement de virions infectieux peuvent être obtenus et ce, sur une période allant jusqu'à 14 semaines. Notons cependant qu'à la différence de l'humain, ces animaux ne développeront pas de fibrose hépatique (Meuleman et Leroux-Roels, 2008; Walters et Katze, 2009). Par ailleurs, ce modèle de souris SCID permet de contourner l'effet d'une quelconque participation de la réponse immunitaire acquise murine à la réponse antivirale observée et d'omettre ainsi une réponse antivirale provenant d'un infiltrat immunitaire. De plus, l'inoculum viral et la durée de l'infection peuvent être contrôlés, ce qui facilite l'interprétation des profils géniques observés.

#### **3.4.4.2 Réponse antivirale**

Une analyse transcriptionnelle de biopsies de foie pratiquées sur ces souris a permis de faire ressortir environ 390 gènes présentant des niveaux d'induction de 2 fois ou plus en présence du VHC par rapport aux contrôles non infectés, observations comparables avec celles obtenues chez les chimpanzés en phase aiguë de l'infection. De plus, il a été démontré que les variations d'expression génique étaient similaires entre différentes souris contenant des hépatocytes provenant du même donneur; par contre le transcriptome était beaucoup plus variable entre les souris contenant des hépatocytes provenant de donneurs différents, indiquant donc clairement que la réponse innée au VHC est largement basée sur des caractéristiques de l'hôte, la souche virale utilisée pour l'infection étant la même pour toutes les souris (Walters et al., 2006a).

Parmi les gènes clairement induits chez les souris infectées avec le VHC, on relève *STAT1*, *IRF9*, *OAS*, *Mx1*, *TLR3*, *MHC1* et *PKR*. Il y a également une stimulation de gènes associés à l'immunoprotéasome, incluant *PSME2*, *PSMB9* et *USP18*, ce dernier jouant un rôle dans la présentation de l'antigène en particulier par le CMH-I. De façon intéressante, de nombreux ISGs surexprimés dans ces souris infectées avec le VHC le sont également chez des chimpanzés en phase aiguë d'une infection avec le VHC ainsi que chez des patients chroniquement infectés avec le VHC (Bigger et al., 2001; Bigger et al., 2004; Smith et al., 2006; Su et al., 2002).

#### **3.4.4.3 Infection avec le VHC et métabolisme lipidique**

Les souris infectées avec le VHC présentaient une induction des gènes relatifs au métabolisme lipidique, en particulier à la biosynthèse et au transport des acides gras. Tout comme chez le chimpanzé, cette modulation tendrait à corrélérer avec les niveaux d'ARN viraux. Un lien a été fait entre la modification du métabolisme lipidique et le stress oxydatif, qui joue d'ailleurs un rôle important dans le développement de la fibrose et de l'hépatocarcinome. Les perturbations du métabolisme lipidique ont en effet été très documentées chez les individus chroniquement infectés avec le VHC, entre autre suite à l'observation d'hypocholestérolémie et de stéatose chez ces patients (Hamamoto et al., 2005; Patel et al., 2005; Petit et al., 2003; Siagris et al., 2006). En effet, les voies de biosynthèse du cholestérol affectent et régulent la réplication du VHC dans la mesure où le cholestérol est un composant essentiel des membranes cellulaires (Su et al., 2002; Ye et al., 2003). D'ailleurs, les protéines impliquées dans le transport du cholestérol ainsi que dans son catabolisme sont clairement induites chez les souris infectées (Walters et al., 2006a). On pourrait donc envisager que le VHC induise la biosynthèse de cholestérol afin de favoriser la formation de nouveaux virions ainsi que la production de membranes intracellulaires qui sont le site de la réplication du VHC.

Finalement, les données de microarrays ont également mis en évidence une augmentation de la synthèse et de la  $\beta$ -oxydation des acides gras, ce qui pourrait faire référence à l'observation de stress oxydatif chez certains des animaux infectés. Or, la production excessive de ROS peut avoir un impact sur le développement de la fibrose ainsi que des hépatocarcinomes. Certaines données préliminaires font d'ailleurs un lien entre des modifications dans les niveaux protéiques associés au métabolisme lipidique et le stress oxydatif qui favoriserait le développement de la fibrose (Jacobs et al., 2005). Des analyses histopathologiques ainsi que des essais immunohistochimiques ont également permis de détecter une augmentation de l'expression de FAS, qui se retrouve

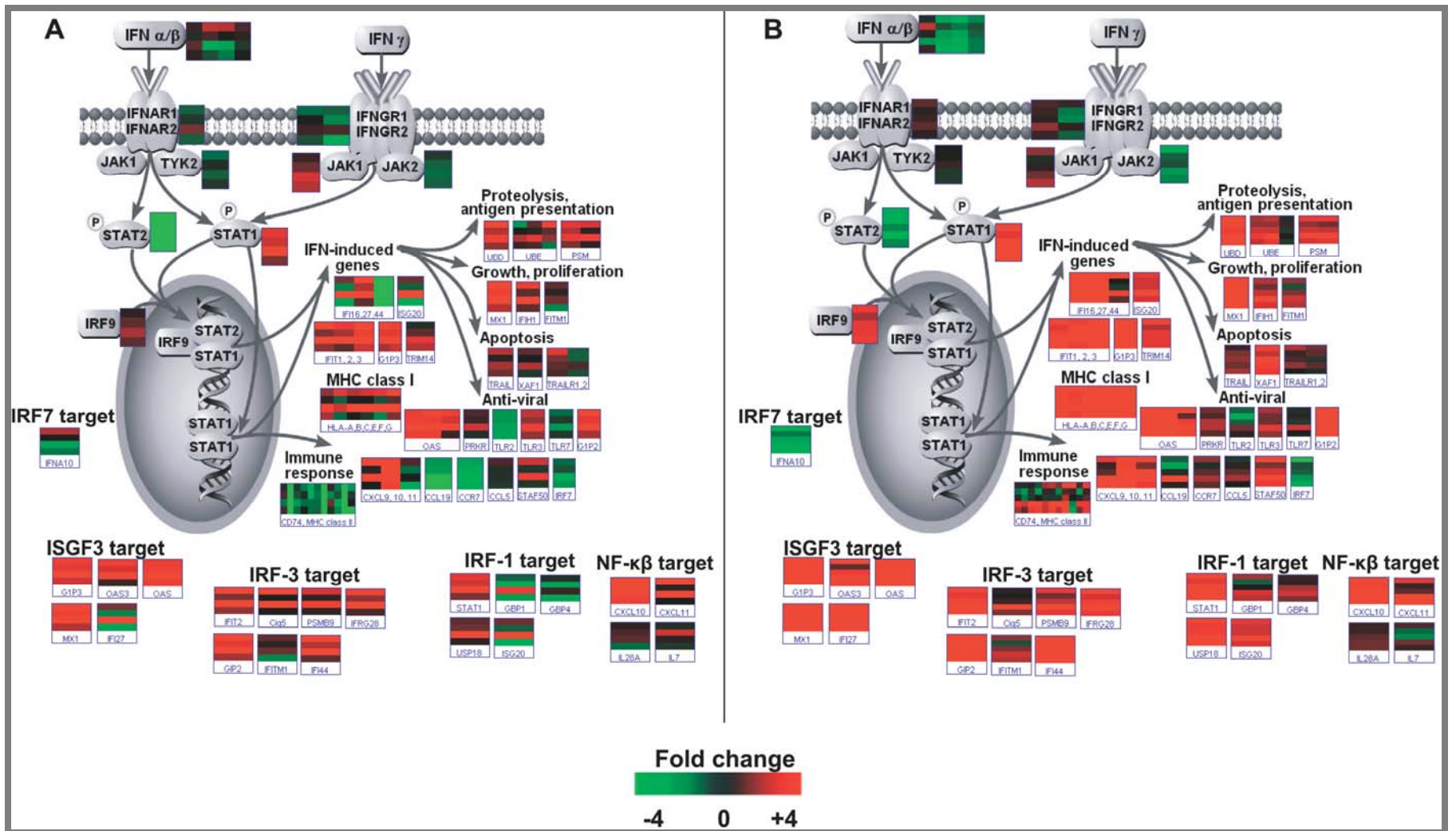
spécifiquement induit chez les animaux infectés, de même qu'une augmentation des dommages hépatocellulaires et de l'activité inflammatoire.

Lorsque l'on compare l'expression différentielle des gènes de la réponse antivirale entre les souris infectées expérimentalement avec le VHC et les biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC, on retrouve, de façon intéressante, un profil d'expression très similaire (**Fig. 25**). Les seules différences observées sont relatives aux gènes impliqués dans la réponse immunitaire spécifique médiée par les infiltrats de cellules immunitaires dont les souris (SCID) sont dépourvues (Walters et al., 2006a).

**Figure 25:** Comparaison de l'induction des voies de signalisation médiées par les interférons dans un modèle de souris infectées avec le VHC (A) et chez des patients chroniquement infectés avec le VHC (B)

Visualisation de l'expression des gènes de la voie IFN dans des souris SCID-beige/Alb-uPA infectées avec le VHC (A) et dans des biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC (B). Les profils d'expression de chaque gène apparaissent dans les boîtes colorées, chaque ligne consistant en une expérience. La normalisation pour chaque expérience de microarrays a été faite à partir du transcriptome provenant de plusieurs de tissus humains hépatiques non infectés. De façon générale, les résultats obtenus dans les deux modèles sont très similaires. On voit une claire induction des gènes associés à l'établissement d'un état antiviral, comme les gènes impliqués dans la présentation des antigènes. Les différences les plus notables apparaissent dans les gènes spécifiquement induits dans les cellules immunitaires comme le CD74 ou le CMHII dont les souris-SCID sont dénuées. Les gènes apparaissant en rouge sont surexprimés par rapport au contrôle, alors que ceux en vert sont sous-exprimés, les gènes en noir ne variant pas. Figure tirée de (Walters et al., 2006a).





### 3.4.5 Réponse antivirale chez le chimpanzé infecté avec le VHC

Les études chez le chimpanzé inoculé avec la souche FL-J6/JFH1 ont révélé une augmentation rapide de la virémie deux semaines après l'inoculation. Suite à la phase aigüe de l'infection, les charges virales ont soit diminué en dessous du seuil de détection, ou bien perduré pendant plusieurs semaines. Cependant, dans chacun des cas, aucun signe clinique d'hépatite n'a pu être observé, et l'élévation sérique des ALT/AST, marqueurs-clé de la présence de dommages hépatiques, est rare. Néanmoins, le VHC est capable d'établir une infection *in vivo* et peut persister chez certains de ces animaux pendant au moins quelques semaines. Des réponses humorales spécifiques au VHC ont été détectées 10 à 13 semaines post-inoculation. De plus, une augmentation des ARNm codant pour les IFN $\gamma$  et OAS1 a été observée dans les biopsies de foie, indiquant la présence d'une réponse antivirale intrahépatique en cours. Parallèlement, l'induction de CD3 $\epsilon$  et d'IFN $\gamma$  indique que les cellules T et/ou NK sont recrutées et activées dans les foies des chimpanzés chroniquement infectés, ce qui corrèle également avec les observations d'infiltrats de cellules immunitaires dans le tissu hépatique humain (Lindenbach et al., 2006).

#### 3.4.5.1 La phase aigüe de l'infection

Une analyse par microarrays a permis de mieux comprendre la réponse antivirale en cours chez un chimpanzé infecté avec le VHC en phase aigüe. Une virémie fut détectée 2 jours suite à l'inoculation ( $2.10^{04}$ ge/ml de sérum) et les titres viraux sériques les plus élevés ont par la suite été relevés à la semaine 4 avec  $4.5.10^{05}$ ge/ml, pour finalement disparaître à la semaine 8. L'ARN viral fut cependant détecté dans le foie jusqu'à la semaine 14. La séroconversion est apparue entre les semaines 6 et 8. De façon générale, les premiers gènes à être induits deux jours après l'infection étaient des gènes de la réponse antivirale innée (*ISG15*, *ISG56*, *2'5'OASL*,...), cependant, aucune induction d'IFN $\beta$  ou  $\alpha$  n'a pu être détectée, possiblement parcequ'inférieure aux niveaux de détection. L'induction des ISGs provient donc soit des hépatocytes infectés qui sont encore capable d'induire les voies de signalisation même plus faiblement, soit des cellules immunitaires infiltrées dans le foie ou encore des hépatocytes non infectés (Bigger et al., 2001). Ces résultats furent également corroborés par d'autres études (Su et al., 2002; Thimme et al., 2001). Le fait que le VHC ne soit pas éliminé en dépit de l'activation de ces puissants ISGs n'est pas encore élucidé.

Différentes cinétiques ont pu être observées selon les groupes de gènes considérés. Les niveaux d'*ISG15*, par exemple, étaient fortement induits aux jours 2 et 7 puis diminués, alors que d'autres gènes comme la chemokine *CXCL10* qui a un rôle majeur dans le recrutement et la

stimulation des monocytes, macrophages, DCs, cellules NK et lymphocytes T, étaient induits beaucoup plus tardivement à la semaine 6. Les gènes codant pour des facteurs de transcription-clé dans la génération d'une réponse antivirale innée, comme STAT1 ou IRF7 sont également induits, de même que des gènes codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité ainsi que des composants du protéasome.

Les gènes impliqués dans l'apoptose sont élevés dès le jour 7, ce qui suggère que l'élimination des hépatocytes infectés se fait bien par cette voie, en parallèle avec l'élévation des niveaux d'ALT, indiquant la présence, même faible, de dommages hépatiques. D'autres gènes comme celui codant pour l'Adipophilin qui est associée aux « lipid droplets », sont également induits (Bigger et al., 2001).

#### **3.4.5.2 La clairance virale**

L'étude de Su et al. a démontré que la clairance virale chez le chimpanzé était largement associée à une augmentation de l'expression des gènes inductibles à l'IFN $\gamma$  (Su et al., 2002). Une réponse intrahépatique médiée par les cellules T corrèle d'ailleurs avec un contrôle de l'infection en phase aigüe (Thimme et al., 2001). Les cytokines et les gènes immunomodulateurs induits jouent un rôle chémotactique essentiel favorisant le recrutement des cellules T ainsi que le processus de présentation de l'antigène relativement tôt dans l'infection (Bigger et al., 2001). Une réponse immunitaire vigoureuse impliquant l'induction de marqueurs de cellules T CD8<sup>+</sup> (antigène CD8 et composantes du récepteur des cellules T), ainsi que des effecteurs de cellules T CD8<sup>+</sup> comme le granzyme A et l'IFN $\gamma$  fut observée chez un chimpanzé ayant ultérieurement résolu son infection (Nanda et al., 2008). Plusieurs études supportent d'ailleurs l'importance de la réponse immune T dans le contrôle de l'infection avec le VHC, la clairance virale étant associée à une réponse vigoureuse des cellules T spécifiques au VHC (Cooper et al., 1999; Gerlach et al., 1999; Lechner et al., 2000; Takaki et al., 2000). Ainsi, un défaut de la réponse adaptative spécifique au VHC est largement proposé comme une cause d'échec à la résolution de l'infection (Bowen et Walker, 2005; Kaplan et al., 2007; Neumann-Haefelin et al., 2005; Rehmann, 2007).

#### **3.4.5.3 La phase chronique**

Des chimpanzés infectés de façon chronique avec le VHC ont été obtenus par l'équipe de Lanford avec un minimum de 7 ans de persistance virale, jusqu'à 23 ans (Bigger et al., 2004). Ces animaux étaient tous séropositifs et la plupart avaient des niveaux élevés d'enzymes hépatiques, indiquant la présence de dommages hépatiques. Une des caractéristiques retrouvée chez l'ensemble

de ces animaux chroniquement infectés était l'induction d'ISGs, dont les gènes *OAS*, *ISG15*, *ISG20*, *ADAR* et *MxA*, une observation commune à plusieurs études sur le sujet (Nanda et al., 2008; Su et al., 2002). Tout comme en phase aigüe, aucune induction d'*IFN $\beta$* ,  $\alpha 2$  ou  $\gamma$  ne fut observée. Les *CXCL9*, *10* et *11* qui jouent un rôle important pour le recrutement des cellules T et NK étaient également induits mais de façon variable selon les animaux et sans corrélérer pour autant avec la charge virale, l'inflammation ou les enzymes hépatiques. Chez ces mêmes animaux, on retrouve également une induction des gènes codant pour les immunoglobulines et certaines protéines du CMH (Bigger et al., 2004). Des gènes associés au métabolisme lipidique et à la biosynthèse des acides gras sont également induits chez des chimpanzés chroniquement infectés avec le VHC (Su et al., 2002). Ces observations indiquent qu'une réponse antivirale est bien en cours, soit en réponse à l'IFN sécrété, même en quantité minimale ou bien en réponse à d'autres cytokines ou à l'ARNdb présent dans le milieu. Des questions perdurent encore tout d'abord à propos de cette réponse antivirale de l'hôte malgré les stratégies de subversion de l'immunité innée par le VHC, mais aussi à propos de cette persistance virale dans un environnement pourtant hostile.

### 3.4.6 Réponse antivirale innée chez l'humain

Comme nous l'avons abordé précédemment, malgré les résultats des études portant sur les fonctions d'interférence des protéines du VHC, en particulier la subversion des voies de signalisation antivirales médiée par NS3/4A, l'analyse transcriptomique de biopsies provenant de modèles de souris infectées avec le VHC ou encore de chimpanzés chroniquement infectés avec le VHC reflète néanmoins très clairement une induction de la réponse antivirale chez l'hôte. Les études portant sur des biopsies de patients chroniquement infectés rapportent, comme nous allons le voir, les mêmes résultats (Bieche et al., 2005; Bigger et al., 2001; Bigger et al., 2004; Helbig et al., 2005; Lau et al., 2008; Lederer et al., 2006; Smith et al., 2006; Smith et al., 2003; Su et al., 2002; Walters et al., 2006a; Walters et al., 2006b).

De façon intrigante, il a en effet été clairement démontré qu'une biopsie de foie de patient chroniquement infecté avec le VHC présentait une forte expression de gènes antiviraux, comme des ISGs, des cytokines pro-inflammatoires et des chémokines. Le paradoxe suivant est donc posé : comment un foie chroniquement infecté avec un virus apte à interférer avec la réponse antivirale de l'hôte est-il en mesure de monter une réponse immunitaire antivirale? En effet, si le virus bloque les voies de signalisation de la réponse antivirale, comment comprendre que cette réponse existe et à l'inverse, si une réponse antivirale est présente, comment le virus y résiste et perdure dans cet environnement?

Les biopsies obtenues de patients chroniquement infectés avec le VHC sont caractérisées entre autre, par la présence d'un infiltrat de cellules immunitaires important, ainsi que des dommages hépatiques avec différents degrés de sévérité à la fois dans le tractus portal et dans le parenchyme hépatique aboutissant à la présence de zones de nécrose. En effet, les lymphocytes T spécifiques au VHC sont les cellules prédominantes dans l'infiltrat cellulaire du foie et sont présents à des fréquences de 10 à 30 fois plus élevées que ceux dans la circulation périphérique (He et al., 1999). D'autre part, les pDCs étant une source importante d'IFN $\alpha/\beta$ , leur participation est également envisageable dans la réponse antivirale observée. Une des questions non élucidée est donc de savoir si les hauts niveaux d'ISGs sont reliés à la présence de ces cellules immunitaires.

D'autre part, les hauts niveaux d'ISGs ont également été associés à la proportion plus ou moins grande d'hépatocytes non infectés qui pourraient induire une réponse antivirale. Encore là, les microarrays sur des Huh7 en culture infectées avec le VHC ont donné des résultats similaires alors que l'on y rapportait que 100% des cellules étaient infectées. C'est donc que l'induction des ISGs pourrait bien provenir des hépatocytes infectés et non uniquement des hépatocytes non infectés et ce, en dépit de la présence d'ARN viral dans ces cellules.

Dans des biopsies de patients chroniquement infectés avec le VHC, des formes nucléaires d'IRF3 ont été retrouvées dans 60% des cas, la proportion de noyaux contenant l'isoforme activée d'IRF3 se retrouvant dans 2.2 à 18% des hépatocytes dans un champ microscopique donné. Parmi les patients chroniquement infectés, la protéine NS3 était détectée dans 9 à 58% des hépatocytes, selon les préparations. Deux types d'observations ont pu être faites: soit la protéase NS3/4A n'était pas détectée, soit elle l'était, mais au niveau de petits foci d'hépatocytes très localisés dans un champ microscopique donné (Lau et al., 2008). Les formes actives d'IRF3 pouvaient quant à elles être observées dans de petits groupes d'hépatocytes, révélant, tout comme le marquage avec l'anti-NS3, de petites régions marquées. En parallèle, les Huh7 infectées avec le JFH1 qui présentaient un IRF3 nucléaire correspondaient aux cellules adjacentes à celles présentant une forte immunoréactivité pour la présence de protéines virales. Le fait qu'IRF3 se retrouve absent des noyaux des cellules fortement positives pour NS3 corrèlerait donc avec un effet d'interférence par la protéase virale.

Ainsi, la réponse immunitaire hépatique à l'infection avec le VHC telle qu'elle a été étudiée *in vivo* par génomique fonctionnelle a révélé une induction globale de gènes antiviraux dans des foies provenant de patients chroniquement infectés ainsi que de chimpanzés expérimentalement infectés avec le VHC. Ces observations ont permis d'avancer l'hypothèse qu'au cours d'une

infection avec le VHC, le virus pourrait à la fois stimuler une réponse immunitaire innée dans le foie et la contrôler. Les hauts niveaux d'ISGs pourraient partiellement provenir des cellules effectrices immunitaires, mais aussi de la production d'IFN de type I par ces mêmes cellules, les pDCs étant une source importante d'IFN.

### **3.5 HCV, fibrose et cirrhose**

L'Hépatite C chronique résulte d'une évolution complexe et multifactorielle, qui, en dépit de l'avancée des connaissances sur la virologie du VHC reste encore obscure. La complexité de la réponse de l'hôte à l'infection avec le VHC a déjà été étudiée à l'échelle du génome complet sur des biopsies de foie provenant d'humains et de chimpanzés. Ces études montrent généralement que le VHC engendre dans les cellules infectées, l'expression de groupes de gènes relatifs à la réponse à l'IFN, au métabolisme des lipides, au stress oxydatif, à l'apoptose, aux chémokines, ainsi qu'aux marqueurs d'inflammation.

Jusqu'à récemment, le virus du VHC était considéré comme un virus non cytopathique, les dommages causés au foie n'étant liés qu'aux mécanismes mis en place par la réponse immunitaire acquise (Nelson, 2001). Cependant, le fait que la progression des dommages hépatiques se trouve accélérée chez les patients immuno-compromis pose question, comme observé chez des patients co-infectés avec le VIH et le VHC par exemple (Mengshol et al., 2007). De plus, les études récentes chez les souris SCID infectées avec le VHC et dont le système de l'immunité acquise est inexistant, montrent clairement une induction de l'apoptose au niveau du foie de ces souris, de façon similaire à ce qui a été observé dans des biopsies de patients chroniquement infectés avec le VHC (Walters et al., 2006a). Au cours d'une infection avec le VHC, l'apoptose observée au niveau des hépatocytes peut donc être à la fois indirectement causée par l'activation du système immunitaire, et directement par le virus. Le phénomène apoptotique au niveau des hépatocytes joue alors un rôle-clé dans le recrutement et l'activation des cellules stellaires et des macrophages et se traduit par une accumulation de matrice extracellulaire, ce qui conduit d'ailleurs éventuellement au développement d'une fibrose puis d'une cirrhose, état avancé de fibrose hépatique dans lequel le tissu hépatique fonctionnel est progressivement remplacé par de la matrice extracellulaire (Bataller et Brenner, 2005; Canbay et al., 2002). D'ailleurs, une expression élevée des gènes codant pour TRAIL, TNF $\alpha$ , FAS et FAS-L a été démontrée chez des patients chroniquement infectés (Mundt et al., 2005; Pianko et al., 2001; Riordan et al., 2006).

De plus, il a été démontré que dans le cas où il y a modification de la motilité intestinale, comme c'est le cas chez nombre de patients chroniquement infectés avec le VHC, il y a souvent une altération de la flore microbienne associée à une diminution de l'intégrité de la muqueuse ainsi que des mécanismes immunitaires, ce qui aboutit à une translocation bactérienne accrue et à une augmentation des niveaux de LPS circulant (Mencin et al., 2009; Wiest et Garcia-Tsao, 2005). Le TLR4, dont le ligand est le LPS, est exprimé sur deux médiateurs clé de la fibrogenèse: les cellules de Kupffer et les cellules hépatiques stellaires (Paik et al., 2003; Seki et al., 2007; Su et al., 2000). Les cellules de Kupffer initient la fibrogenèse en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques en réponse aux LPS, alors que les cellules hépatiques stellaires sont la source prédominante de production de la matrice extracellulaire dans le foie fibrotique (Bataller et Brenner, 2005). Le relâchement de TGF $\beta$  par les cellules de Kupffer activées entraîne l'activation des cellules stellaires ce qui stimule davantage le développement de la fibrose. Une étude récente a d'ailleurs démontré qu'une seule modification de nucléotide dans le polymorphisme du TLR4 pouvait conférer une réduction significative du risque de progression vers la fibrose chez les patients chroniquement atteints d'hépatite C (Li et al., 2009b; Mencin et al., 2009).

Le foie est probablement un des meilleurs exemples soulignant le lien entre inflammation chronique et cancer. En effet, 80% des cancers hépatocellulaires dans le monde occidental sont développés en conséquence à une inflammation chronique et arrivent dans des foies fibrotiques et cirrhotiques (Bosch et al., 2004). L'implication de la voie de signalisation des TLRs dans les cancers associés à la fibrose n'a pas été encore investiguée. Cela dit, comme nous l'avons vu précédemment, les patients atteints d'infection chronique avec le VHC présentent des niveaux sériques d'endotoxines plus de 10 fois plus élevés que la normale. Plusieurs ligands du VHC agissent d'ailleurs comme agonistes des TLRs (Chang et al., 2007b; Dolganiuc et al., 2004). Comme nous l'avons vu précédemment, le VHC agit négativement sur les voies de signalisation innées qui pourraient limiter la répllication du virus mais il génère en même temps un état inflammatoire chronique à l'origine de dommages persistants dans le foie (Ishii et Koziel, 2008; Rehmann et Nascimbeni, 2005). Il est également important de mentionner que si certains TLRs destinés à la détection du VHC sont inhibés par le virus, d'autres peuvent être activés et favoriser la progression vers une inflammation chronique. Ainsi, il a été démontré que Core et NS3 pouvaient activer le TLR2, un phénomène absent chez des souris déficiente en MyD88 ou TLR2 (Dolganiuc et al., 2004). Une autre publication a démontré que Core et NS3 pouvaient favoriser la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL10) dans des macrophages humains via les hétérodimères TLR2/TLR1 et TLR2/TLR6 (Chang et al., 2007b). Il y aurait donc une diminution de

l'activation des voies de signalisation médiées par les TLRs visant à l'éradication du virus, mais une augmentation de l'activation des TLRs liés à l'inflammation (Mencin et al., 2009).

## 3.6 HCV et traitements

### 3.6.1 Généralités

Le type de thérapie recommandé pour une infection avec le VHC repose sur une combinaison d'IFN pégylé et de ribavirine pendant 24 à 48 semaines qui permet cependant d'avoir des résultats positifs chez seulement la moitié des patients (Fried et al., 2002; Manns et al., 2001). Les outils permettant d'étudier les causes d'une telle résistance sont malheureusement réduits en raison de la difficulté d'obtenir des modèles animaux pour étudier cette infection. En ce qui concerne cette résistance au traitement, on sait que de nombreux facteurs sont à considérer, comme le rôle des réponses immunitaires acquises et innées propres à chaque individu, les facteurs génétiques de l'hôte ou encore la diversité génétique virale. En effet, un des obstacles majeurs à la réussite d'un traitement anti-VHC repose également sur la nature hautement répliquative du VHC ainsi que sa capacité à modifier sa séquence nucléotidique de façon à générer des clones résistants à un inhibiteur spécifique initialement extrêmement efficace.

Une étude randomisée a permis de démontrer que suite à un traitement anti-VHC classique, une réponse positive et soutenue (définie par l'absence de virus dans le sang périphérique 24 semaines après la fin du traitement) a été rapportée chez 42-52% des patients infectés avec le VHC de génotype 1 et 76-82% des patients infectés avec le VHC de génotype 2 ou 3 (Fried et al., 2002; Manns et al., 2001). On peut classer le type de réponse à la thérapie anti-VHC en trois catégories:

- une réponse nulle, qui se définit par un déclin de la charge virale de moins de 2  $\log_{10}$  après 12 semaines de traitement.
- une réponse partielle ou lente, qui se caractérise par un déclin de la charge virale de plus de 2  $\log_{10}$ , mais par une virémie détectable à la semaine 12 puis une clairance à partir de la 24<sup>e</sup> semaine.
- Une réponse rapide et complète, où la charge virale est indétectable à partir de la 4<sup>e</sup> semaine de traitement.

Cela dit, cette thérapie est associée à des effets secondaires particulièrement néfastes et elle ne peut être donnée à tous les patients : ceux dont la maladie hépatique est trop avancée, par exemple, seront traités par une intervention chirurgicale.



Si le mécanisme antiviral exact de l'IFN n'est pas clairement connu, les données obtenues jusqu'à maintenant suggèrent que ses actions immuno-modulatrices sont primordiales. Quelques heures après l'administration de l'IFN chez des patients infectés avec le VHC, un déclin de la virémie peut être observé, ce qui suggère que l'IFN induit un arrêt complet de la production virale dans les hépatocytes infectés (Neumann et al., 1998). Cette observation a été complétée 10 ans plus tard par celle d'un état antiviral cellulaire qui se traduit par l'induction de l'expression de nombreux gènes induits par l'IFN tels qu'observés dans des biopsies de foie chez des patients traités (Sarasin-Filipowicz et al., 2008). En plus de leur rôle crucial dans la régulation de l'immunité innée, nous savons également que les IFNs stimulent et augmentent les réponses immunitaires acquises spécifiques au VHC. En effet, les IFNs de type I induisent les unités de l'immunoprotéasome, ce qui stimule le processus menant à la présentation de l'antigène. De plus, ils stimulent la prolifération des lymphocytes T mémoire, la différenciation des DCs tout en augmentant l'expression du CMHI au niveau des hépatocytes (Katze et al., 2002). Ainsi, les IFNs de type I exercent leur effet antiviral sur le VHC à la fois à travers des mécanismes antiviraux directs ainsi que des mécanismes immuno-modulateurs indirects.

La ribavirine, quant à elle, agirait comme un agent mutagène, en insérant des mutations létales dans le génome viral, tout en ayant une activité d'immunomodulation par augmentation des niveaux d'ISGs et diminution des régulateurs négatifs des voies de l'IFN comme PP2A et SOCS1 (Feld et al., 2007).

### **3.6.2 Nouvelles approches thérapeutiques**

Comme nous l'avons vu plus haut, un nombre important de patients chroniquement infectés avec le VHC sont résistants au traitement avec l'IFN. L'échec de réponse du patient au traitement est dû à un ensemble de facteurs viraux mais aussi émanant de l'hôte comme la race, l'âge, l'obésité, la résistance à l'insuline, la stéatose hépatique, qui sont tout autant de facteurs défavorables à la réussite du traitement. Mentionnons également l'importance de la phase de la maladie au moment du traitement puisqu'un patient en phase aiguë de l'infection aura plus de chance de guérison qu'un patient en phase chronique (Badr et al., 2008).

Les progrès réalisés dans la compréhension des facteurs contribuant à la résistance au traitement avec l'IFN ont ouvert les portes à de nouvelles cibles antivirales, incluant des facteurs viraux, mais aussi cellulaires. Parmi les agents utilisés, on retrouve des inhibiteurs enzymatiques, des analogues nucléotidiques ciblant l'ARN viral ou encore des immunomodulateurs (Pawlotsky, 2006b).

### 3.6.2.1 Agents antiviraux non spécifiques

Une approche thérapeutique basée sur l'utilisation de nouveaux types d'IFNs a été envisagée, comme le CIFN pour « Consensus interferon », un IFN recombinant contenant une séquence consensus avec les acides aminés les plus fréquemment retrouvés dans l'ensemble des IFNs naturels. Cela dit, les résultats n'ont pas été ceux escomptés. L'Albuferon est une protéine recombinante d'IFN $\alpha$  en fusion avec la protéine d'albumine humaine, qui augmente la durée de vie sérique de l'IFN en modifiant son profil pharmacocinétique, ce qui améliore son efficacité (Bain et al., 2006; Osborn et al., 2002). Des essais cliniques ont démontré qu'utilisée en combinaison avec la ribavirine, cette molécule était au moins aussi efficace que l'IFN $\alpha$  pégylé, avec l'avantage d'une diminution de fréquence d'anticorps contre l'IFN $\alpha$  (Zeuzem, 2008). Un essai clinique de phase III est en cours chez des patients chroniquement infectés avec le VHC.

L'IL29 (IFN $\lambda$ 1) possède une activité antivirale puissante contre le VHC *in vitro* qui a l'avantage d'induire de façon persistante les ISGs (Marcello et al., 2006). Un essai clinique en phase Ib avec du PEG-IFN $\lambda$ 1 chez des patients réfractaires au traitement classique a donné des résultats encourageants. Aucun effet secondaire grippal ou d'altérations d'ordre hématologique ne furent observés, probablement reflétant une distribution différente des récepteurs de ces IFNs (Miller et al., 2009).

La ribavirine agit en inhibant la déshydrogénase monophosphate inosine (IMPDH), une enzyme cellulaire impliquée dans la production de la guanine (Feld et Hoofnagle, 2005). Utilisée seule, la ribavirine n'a pas d'effet antiviral significatif, mais c'est en combinaison avec l'IFN $\alpha$  que son action augmente considérablement les probabilités d'éradiquer l'infection en comparaison avec les monothérapies à l'IFN. La viramidine est un dérivé de la ribavirine qui est préférentiellement métabolisé dans le foie et qui ne s'accumule pas dans les érythrocytes, un des inconvénients de la ribavirine (Watson, 2002). Ce composé pourrait être un substitut de la ribavirine pour les patients développant des anémies sévères. L'amantadine est un dérivé aminé tricyclique, utilisé dans le traitement de l'infection avec l'influenza A. En monothérapie, l'amantadine a une faible activité contre le VHC, mais sa combinaison avec l'IFN $\alpha$  pégylé et la ribavirine augmenterait le potentiel antiviral de ces derniers (Deltenre et al., 2004).

### 3.6.2.2 Agents antiviraux spécifiques

#### 3.6.2.2.1 Inhibiteurs de la protéase NS3/4A

Les agents dont le développement clinique est allé le plus loin sont les inhibiteurs de la protéase NS3/4A. En effet, bien qu'il ait été difficile de construire des inhibiteurs de NS3/4A puissants et à haute affinité, cette dernière est devenue une cible majeure puisqu'elle joue un rôle primordial à la fois dans le clivage de la polyprotéine précurseur du VHC, mais aussi dans la résistance au système de défense antivirale de l'hôte. La structure cristallographique de la protéase NS3/4A pleine longueur a révélé que des résidus de la protéase NS3 à l'extrémité carboxy-terminale étaient localisés au niveau du site actif (Yao et al., 1999). Ceci est donc consistant avec l'inhibition de l'activité protéolytique par de petits peptides dont la séquence mimerait l'extrémité C-terminale (Steinkuhler et al., 1998). Les composés peptidomimétiques ont donc été dominants tout au long de la recherche d'inhibiteurs de la NS3/4A, certains ayant été modifiés afin de produire des composés cycliques.

Le premier de ces composés à avoir atteint la phase d'étude clinique est le BILN2061, causant une diminution de 2.5 log<sub>10</sub> des niveaux d'ARN viraux plasmatiques après seulement deux jours de thérapie (Lamarre et al., 2003). Des inhibiteurs macrocycliques plus récents comme le ITMN-191 et le TMC434350 sont également en phase clinique alors que deux inhibiteurs peptidomimétiques utilisant une kétoamide linéaire, le Telaprevir VX-950 et le boceprevir SCH503034 sont en phase IIB/III (Hezode et al., 2009). Contrairement à BILN2061, le Telaprevir forme un complexe covalent mais réversible avec NS3/4A, via l'inclusion d'un  $\alpha$ -ketoamide au niveau du site actif de l'enzyme (Lin et al., 2006a). C'est un puissant inhibiteur de la protéase NS3/4A avec des résultats intéressants en essai clinique de phase IB, dont une diminution de 4.4 log<sub>10</sub> de la charge virale après 12 jours de thérapie (Reesink et al., 2006). Par contre, ces études ont démontré une rapide progression de souches virales résistantes ayant émergé entre le jour 4 et le jour 7 de traitement, suggérant que ces mutants étaient possiblement présents avant même le début du traitement qui permettrait en fait leur sélection. Ces mutants ont néanmoins disparu avec l'administration concomitante du PEG-IFN $\alpha$  avec ou sans ribavirine (Kieffer et al., 2007). Son efficacité a été démontrée en essai clinique de phase II particulièrement en combinaison avec le PEG-IFN $\alpha$ -2a et la ribavirine (Hezode et al., 2009; McHutchison et al., 2010). Le Telaprevir est actuellement en phase III tout comme le Boceprevir, ces deux agents montrant, en combinaison avec le PEG-IFN $\alpha$ -2b, des résultats encourageants. Les ITMN-191 et TMC435350 mentionnés précédemment sont des nouveaux inhibiteurs oraux de la protéase virale, le premier ayant un profil

de résistance croisée favorable avec le VX-950 et d'autres térapeptides linéaires (Seiwert et al., 2008). Ces composés sont en cours d'études chez des patients chroniquement infectés avec le VHC (Reesink et al., 2010).

Il est néanmoins important de noter que si ces inhibiteurs inhibent le clivage de CARDIF, il n'y a pas encore de données *in vivo* indiquant une récupération de la réponse IFN endogène qui pourrait contribuer à l'effet antiviral chez ces patients. Il semblerait pour l'instant que des doses beaucoup plus élevées soient nécessaires pour récupérer cette fonction à comparer avec la simple inhibition de la réplication (Liang et al., 2008).

#### 3.6.2.2.2 Inhibiteurs de la polymérase NS5B

La polymérase NS5B du VHC est responsable de la synthèse de l'ARN viral au cours de la réplication. Parce que les humains ne possèdent pas une telle polymérase à ARN dépendante de l'ARN, ceci en fait une cible particulièrement intéressante. Les efforts menés pour développer des inhibiteurs de la polymérase NS5B ont largement bénéficié de données obtenues par cristallographie (Lesburg et al., 1999). Un certain nombre de petites molécules inhibitrices de la polymérase NS5B ont été identifiées et se regroupent en deux grandes catégories: les analogues de nucléosides s'attachant au site actif de la polymérase et les inhibiteurs allostériques non-nucléosidiques qui s'attachent à des sites localisés à une distance variable du site actif et qui comprennent différentes classes chimiques comme les benzimidazoles, les benzothiadiazines, et les acides thiophene 2-carboxyliques (Carroll et Olsen, 2006; Hang et al., 2009). Contrairement aux analogues nucléosidiques qui inhibent à la fois l'initiation et l'élongation de la synthèse d'ARN, les inhibiteurs allostériques inhibent seulement l'initiation de la synthèse et non l'élongation (Biswal et al., 2005).

Plusieurs groupes se sont intéressés aux analogues de nucléosides, permettant d'arrêter la polymérisation de la chaîne d'ARN suite à leur conversion en nucléotides (Lee et al., 2006a). On peut citer le R1626, un dérivé du R1479 (4'-azido-cytidine), qui se retrouve en phase clinique II et qui peut être utilisé en combinaison avec le PEG-IFN $\alpha$ -2a et la ribavirine (Pockros et al., 2008; Roberts et al., 2008; Toniutto et al., 2008). Le NM283 (valopicitabine) est également un analogue de nucléoside en phase II d'essai clinique. En plus d'induire la terminaison de la polymérisation de la chaîne, cet agent a un effet inhibiteur direct sur l'enzyme (Huang et al., 2006; Pierra et al., 2006). Le A-837093 est un nouvel inhibiteur de la polymérase qui démontre une puissante efficacité antivirale dans le modèle du chimpanzé (Chen et al., 2007) et qui pourrait être utilisé en combinaison avec d'autres petites molécules inhibitrices, comme avec des inhibiteurs de la protéase

NS3/4A par exemple. Il n'existe pas encore d'essais cliniques utilisant des dérivés non-nucléosidiques, en partie parce que le développement de résistance lié à des mutations dans la région d'attachement des inhibiteurs demande davantage d'études (Tan et al., 2004). Bien que les inhibiteurs de polymérase soient moins avancés en étude clinique que les inhibiteurs de protéase, ils n'en demeurent pas moins intéressants (Carroll et al., 2009; Roberts et al., 2008).

#### 3.6.2.2.3 Inhibiteurs de la traduction protéique

Les oligonucléotides antisens permettent la formation d'hybrides RNA-RNA et RNA-DNA qui résultent en une inhibition de la traduction des protéines virales ou de la réplication (Zhang et al., 1999). AVI-4065 inhibe la traduction des protéines du VHC *in vitro* ainsi que dans certains modèles animaux et des essais cliniques de phase II sont déjà en cours (Pawlotsky et al., 2007). Cela dit, les résultats sembleraient assez décevants chez l'humain (McHutchison et al., 2006). En effet, si les résultats semblent prometteurs *in vitro*, c'est leur administration *in vivo* qui est encore problématique (Fish et Kruithof, 2004). L'ARN à interférence appelé SirnaAV34 devrait pour sa part entrer en phase préclinique (De Francesco et Migliaccio, 2005; Kanda et al., 2007).

Les ribozymes sont des molécules synthétiques d'ARN catalytique résistantes aux nucléases et qui agissent par clivage des séquences ARN du VHC (Sakamoto et al., 1996). L'Heptazyme est un ribozyme dirigé contre la région de l'IRES du VHC qui a progressé jusqu'aux essais de phase clinique chez des patients chroniquement infectés avec le VHC, mais qui a finalement été abandonné suite à un constat de toxicité dans un modèle animal.

#### 3.6.2.2.4 Prévention de l'attachement du virus

Comme nous l'avons vu au cours de la description du cycle viral, les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 ainsi que les molécules de surface de la cellule hôte comme SR-B1, Claudin 1 ou encore CD81 ont un rôle critique pour l'attachement du virus à la membrane de la cellule puis pour son endocytose subséquente. Ainsi, l'inhibition de l'entrée du virus peut être basée sur le développement de petites molécules inhibitrices qui pourraient agir au site d'attachement de la particule virale aux récepteurs cellulaires, ou bien sur le développement d'anticorps spécifiques aptes à neutraliser les particules infectieuses. Ainsi, la Cyanovirine-N est une petite protéine soluble qui s'attache à des sites glycosylés et conservés de la glycoprotéine de surface E2 et qui semble prévenir l'interaction entre E2 et le CD81 dans des modèles expérimentaux (Helle et al., 2006). Des peptides mimant les régions conservées d'E2 sont également développés en tant qu'inhibiteurs compétitifs qui pourraient éviter la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte.

Récemment, l'activité antivirale de peptides dérivés d'E2 comme le GNS-037 ont donné des résultats *in vitro* encourageants (Waters et Nelson, 2006).

Des immunoglobulines polyclonales et des anticorps monoclonaux comme HCV-AB 68 et HCV-AB 65 ont été évalués au cours d'essais cliniques chez des patients chroniquement infectés avec le VHC et ayant subi une transplantation hépatique. Les résultats préliminaires obtenus sont intéressants. En effet, certains de ces anticorps aboutissent à une réduction de la virémie sans effet secondaire majeur (Galun et al., 2007; Pawlotsky, 2007; Pawlotsky et al., 2007).

Bien que la majorité des efforts dans la découverte de composés anti-VHC cible des activités enzymatiques définies de la polyprotéine, certaines données récentes ont démontré qu'il était possible d'inhiber d'autres fonctions non enzymatiques mais essentielles. Par exemple, plusieurs puissants inhibiteurs ont été identifiés par criblage à grande échelle grâce à des essais cellulaires basés sur l'amplification du réplicon du VHC et qui seraient dirigés contre NS5A. Le fonctionnement exact de ces inhibiteurs n'est pas connu, mais des données cliniques récentes avec le BMS-790052 sont particulièrement intéressantes, puisqu'une seule dose de ce composé produirait une baisse de  $3.6 \log_{10}$  de diminution de la virémie sur une durée de 6 jours. Le Clemizole, inhiberait quant à lui une interaction récemment découverte entre l'ARN et la protéine NS4B et induirait une forte diminution de la réplication virale (Einav et al., 2008).

#### 3.6.2.2.5 Inhibiteurs de l'assemblage et du relâchement

Les inhibiteurs des glycosidases cellulaires sont de potentiels candidats pour une thérapie antivirale permettant d'inhiber l'assemblage viral ainsi que le relâchement. Le Celgosivir ou MX-3253 est un puissant inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase I qui est impliquée dans l'assemblage du VHC ainsi que son relâchement (Waters et Nelson, 2006). Des études de combinaison avec le PEG-IFN $\alpha$  et la ribavirine sont en cours.

#### 3.6.2.3 Agents immunorégulateurs

Plusieurs traitements en développement ciblent la modulation du système immunitaire de l'hôte afin d'améliorer l'efficacité des thérapies anti-VHC. Le rôle de sentinelle des cellules immunitaires innées comme les cellules dendritiques, les cellules NK et les macrophages dans leur capacité de reconnaître des PAMPs est largement reconnu. Certaines thérapies ont pris avantage de ce contexte pour tenter d'augmenter la réponse TLR. L'Isatoribine est un agoniste du TLR7 qui a permis la réduction de la virémie de 12 patients chroniquement infectés avec le VHC après 7 jours

d'administration intraveineuse (Horsmans et al., 2005). Le Resiquimod, un nouvel agoniste du TLR7 et du TLR8 a fait l'objet de deux études récentes, cela dit, les effets secondaires liés à l'induction de l'IFN $\alpha$  étaient excessifs (Pockros et al., 2007). Une autre molécule visant le TLR9 a également été testée : à la dose la plus forte, le CPG10101 induirait une réduction de la charge virale de 1.4 log après 4 semaines de traitement (Bacon et McHutchison, 2007; McHutchison et al., 2007).

Nous savons que les patients développant des réponses cytotoxiques CD4 $^{+}$  et CD8 $^{+}$  puissantes parviennent à éliminer l'infection en phase aiguë et peuvent mieux contrôler l'infection en phase chronique (Cooper et al., 1999). L'identification de déterminants antigéniques importants dans la résolution de l'infection chez des individus ayant eu une clairance virale spontanée ont mené les chercheurs au concept de vaccin thérapeutique. Ces antigènes sont produits en laboratoire et administrés aux patients. Les données préliminaires démontrent une amélioration notable de la réponse immunitaire contre les antigènes du VHC, mais les impacts sur la charge virale sérique ne sont pas modifiés significativement. Une autre stratégie repose donc sur la stimulation par des vaccins thérapeutiques de la réponse cellulaire de l'hôte contre le virus. L'IC41 est un vaccin contenant plusieurs épitopes du génome viral du VHC ainsi que l'arginine comme adjuvant. Ce composé en phase clinique II induit des réponses immunitaires significatives et des réductions transitoires des niveaux d'ARN viral sériques (Pereira et Jacobson, 2009). L'IL29, de façon similaire à l'IFN $\alpha$ , stimule la voie Jak/STAT. Récemment, l'activité de la forme pégylée de l'IL29 a été évaluée chez l'animal et a démontré une activité pharmacologique induisant l'expression de biomarqueurs connus et de gènes de réponse à l'IFN au niveau de biopsies de foie de patients chroniquement infectés avec le VHC. De façon particulièrement intéressante, contrairement à l'IFN $\alpha$ , le PEG-IL29 est actif dans le foie et non dans les cellules immunitaires circulantes, ce qui diminue les risques d'effets secondaires (Webster et al., 2009).

Les cyclophilines, une famille de peptidyl-propyl cis/trans isomérases ont démontré un rôle significatif dans la réplication du VHC. Basé sur des découvertes chez des chimpanzés ainsi que sur des patients chroniquement infectés avec le VHC, la cyclosporine, une drogue immunosuppressive, supprimerait l'ARN viral du VHC en inhibant la PPIase (Peptidylprolil-Isomerase) (Nakagawa et al., 2004). Le DEBIO-025 est une nouvelle forme non-immunosuppressive de la cyclosporine. D'autres analogues de cyclosporine sont actuellement en essai (Waters et Nelson, 2006).

D'autres agents impliqués dans la biosynthèse lipidique et le stress oxydatif sont également sous investigation (Cholongitas et Papatheodoridis, 2008). En effet cette stratégie permettrait à la fois de

surmonter la résistance au traitement à l'IFN et de cibler des facteurs protéiques de l'hôte qui supportent le cycle viral. Cette stratégie permet d'éviter d'être confronté à la mutagenèse virale rapide, mais le potentiel de toxicité cellulaire se voit tout de même largement augmenté.

Comme nous l'avons vu dans cette dernière section, plusieurs agents antiviraux démontrent des résultats encourageants leur permettant d'accéder ou d'être déjà en phase d'étude clinique. Cela dit, outre la nécessité que ces agents soient à la fois sécuritaires et efficaces, ils devront également être actifs devant le nombre important de variants viraux, le phénomène de mutants d'échappement étant presque inévitable. Il est donc de plus en plus évident que c'est la combinaison de plusieurs thérapies qui permettra d'éradiquer le VHC en ciblant à la fois des facteurs viraux, mais aussi de l'hôte.



## OBJET DE LA THÈSE

Nous avons mis à profit le modèle tout à fait unique de culture d'hépatocytes primaires humains fraîchement isolés à partir de sections de foies sains ou chroniquement infectés avec le VHC dont nous avons bénéficié grâce à une collaboration avec le Dr Bilodeau et son équipe. En utilisant les technologies de PCR quantitatif et de microarrays, nous avons été en mesure de dresser à l'échelle du transcriptome, les profils d'expression génique spécifiques à la voie médiée par le récepteur à ARNdb extracellulaire TLR3 et celle médiée par le récepteur intracellulaire RIG-I/MDA5. Ces résultats font l'objet de la première partie de l'article 1 (Chapitre 2).

Suite à une meilleure définition et compréhension de la réponse antivirale dans des hépatocytes primaires normaux, nous nous sommes intéressés à la qualité de cette réponse dans le contexte d'une infection avec le VHC. La protéase virale NS3/4A ayant un rôle majeur à la fois dans le clivage de la polyprotéine précurseur du VHC mais aussi dans la subversion de l'immunité innée, nous nous sommes donc intéressés à l'effet de cette protéase exprimée de façon ectopique sur la réponse antivirale dans notre modèle cellulaire. En effet, s'il avait été démontré que cette protéine virale pouvait interférer avec la réponse antivirale dans un modèle de réplicon exprimé dans des lignées hépatocytaires, rien encore n'avait été clairement établi dans des hépatocytes primaires humains en culture. Cette étude se retrouve dans la seconde partie de l'article 1 (chapitre 2). Dans le chapitre 3 de la thèse, nous présentons une analyse exhaustive des résultats obtenus par microarrays qui ne figurent pas dans l'article 1, et qui portent sur l'effet de la NS3/4A sur les deux voies antivirales médiées par TLR3 et RIG-I/MDA5 à l'échelle du transcriptome. Nous y introduisons l'effet de la NS3/4A sur un groupe de gènes associés à la régulation de l'apoptose et du programme de mort cellulaire, un aspect particulièrement intéressant si l'on considère les données récentes obtenus dans certains modèles *in vivo* d'infection avec le VHC.

Disposant de matériel provenant de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC, nous nous sommes également intéressés à la caractérisation des voies de reconnaissance de l'ARNdb dans un contexte infectieux physiologique. Comme nous l'avons abordé en introduction (Chapitre 1) avec la description de la réponse antivirale au VHC dans différents modèles d'infection, un paradoxe majeur découle de l'observation intrigante qu'il existe lors d'une infection chronique avec le VHC, une réponse antivirale puissante en dépit des mécanismes de subversion de l'immunité innée mis en place par le VHC, et ce autant chez le chimpanzé, la souris chimérique et l'humain. Une des questions soulevée est donc de comprendre comment une réponse antivirale peut être instaurée si le virus l'entrave et, inversement, comment l'infection virale perdure si une réponse

antivirale est en cours, et ce pendant plusieurs décennies au cours desquelles se conjuguent persistance virale et dommages hépatiques progressifs. Dans l'article 2 (chapitre 4), nous présentons donc une étude de cette réponse antivirale à partir de biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC, et nous caractérisons cette réponse apparemment efficace mais incomplète. Finalement, certains résultats supplémentaires non publiés ainsi que deux articles en annexe seront également abordés en discussion (chapitre 5) dans laquelle nous dégagerons les points majeurs abordés dans cette thèse ainsi que les lignes directrices qu'il serait particulièrement intéressant de poursuivre toujours avec l'objectif d'améliorer nos connaissances portant sur l'interaction virus/hôte, notion fondamentale à la base du concept de persistance virale.

## **CHAPITRE 2: Article 1**

### **Distinct Antiviral Signaling Pathways in Primary Human Hepatocytes and their Differential Disruption by HCV NS3 Protease**

## 1. Mise en contexte et présentation

Une des causes majeures du ralentissement de la recherche sur l'infection avec le VHC repose sur la limitation de ses modèles d'étude. L'ARN viral double brin est un marqueur-clé d'une infection virale. Plusieurs voies de signalisation sont utilisées par l'hôte afin de répondre adéquatement aux pathogènes viraux. Dans leur vaste majorité, les lignées hépatocytaires ne possèdent pas de voie de détection de l'ARN viral puisqu'elles sont déficientes à la fois dans la voie médiée par le TLR3 mais aussi dans celle médiée par RIG-I. Ainsi, l'étude et la compréhension de l'interaction virus/hôte dans le cadre de l'infection avec le VHC et en particulier l'immunité antivirale, ne repose principalement que sur des données obtenues à partir de lignées hépatocytaires et d'un modèle infectieux, le JFH1.

Le modèle du JFH-1, ainsi que des données préliminaires obtenues avec le réplicon non infectieux, ont permis de décrire deux mécanismes majeurs d'interférence de l'immunité innée par le VHC médiés par NS3/4A. Ainsi, cette protéase serait responsable du clivage des deux adaptateurs-clé des voies de détection de l'ARNdb, CARDIF et TRIF. Pourtant, si le clivage de CARDIF a clairement été démontré dans différents modèles, à la fois dans des lignées hépatocytaires, mais aussi dans des biopsies provenant de patients chroniquement infectés avec le VHC, le clivage de TRIF reste encore une source de débat. Ce clivage fut initialement démontré *in vitro* par réaction enzymatique, mais n'a pas pu être clairement identifié *in vivo*.

La première partie de l'article 1 vise tout d'abord la validation de la fonctionnalité des voies de détection d'ARNdb intracellulaire et extracellulaire dans des hépatocytes primaires humains, fraîchement purifiés. Cette validation nous a semblé essentielle, dans la mesure où aucune étude n'avait caractérisé ces voies antivirales dans des hépatocytes primaires. L'obtention d'échantillons humains hépatiques repose sur une étroite collaboration entre chercheurs, chirurgiens et infirmiers ainsi que sur un protocole de recherche minutieusement établi. Une fois la biopsie obtenue, le second obstacle majeur repose sur la difficulté d'isolation des hépatocytes. Comme nous l'avons vu en introduction, les hépatocytes constituent 80% de la biopsie, cependant leur purification et leur mise en culture est un processus long et fastidieux. Ce fut donc l'objet d'une collaboration avec l'équipe du Dr M. Bilodeau qui élaborera une technique d'isolation et de purification des hépatocytes normaux à partir de biopsies de foies.

Au moyen d'études de dose-réponses et de cinétiques, nous avons pu valider la fonctionnalité des deux voies majeures de détection d'ARNdb dans des hépatocytes primaires. Nous avons en effet clairement démontré l'existence d'une réponse antivirale caractérisée par l'induction

d'IFN de type I, d'ISGs, de chémokines et cytokines pro-inflammatoires suite à l'ajout de poly(I:C) dans le milieu (voie TLR3/TRIF) ou suite à sa transfection (voie MDA5/CARDIF). Nous avons approfondi cette étude à l'échelle transcriptomique en utilisant des microarrays ce qui nous a permis d'obtenir une signature précise des deux voies de signalisation, et d'en faire ressortir les spécificités.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons voulu valider les mécanismes d'interférence par la protéase du VHC dans des hépatocytes primaires humains. Nous avons opté pour un système d'expression particulièrement bien adapté aux cellules à faible capacité proliférative, le système des lentivirus, qui nous a permis d'obtenir une efficacité de transduction de plus de 80%. Par immunobuvardage, nous avons clairement démontré le clivage de CARDIF dans les hépatocytes exprimant NS3/4A ainsi que son rétablissement à sa forme native en présence de BILN2061, un inhibiteur spécifique de NS3/4A. Suite à ce clivage, la réponse antivirale était clairement affectée puisque l'expression de gènes comme l'*IFN $\beta$* , *IFIT1*, *CCL5* ou encore les *IFN $\lambda_{1,2,3}$*  était significativement diminuée. Par contre, suite à l'ajout de BILN2061, l'induction de ces gènes se retrouvait tout à fait rétablie de façon concomitante au rétablissement de CARDIF. En ce qui concerne la voie TLR3, nous n'avons pas observé de clivage ou de diminution de TRIF suite à l'expression de NS3/4A. L'analyse du transcriptome en présence de la protéase avec ou sans BILN2061 dans le cadre d'une stimulation de la voie médiée par le TLR3 révéla néanmoins que cette voie est affectée par NS3/4A, mais beaucoup moins que la voie intracellulaire, et de façon indépendante de son activité protéolytique.

## 2. Contributions de la candidate

Cet article a été soumis au Journal of Hepatology en juin 2009 et accepté avec des corrections mineures en septembre 2009. Il est maintenant publié dans le volume 52 (2), p. 167-175 en février 2010. La candidate a effectué la culture des hépatocytes primaires, les différents types de stimulation, ainsi que les expériences de cinétique et de dose-réponse. La candidate a également effectué l'isolation de l'ARN total pour la majorité des préparations hépatocytaires, ainsi que les PCRs quantitatifs. La candidate a également analysé les données en microarrays en utilisant les logiciels d'analyse Mev (MultiExperiment Viewer) et DAVID. Concernant les données avec la protéase virale, la candidate a effectué le marquage des hépatocytes primaires ainsi que la microscopie par fluorescence. Les Fig.4 A et B d'analyse des données obtenues par microarrays ont également été effectués par la candidate, de même que la rédaction de l'article ainsi que la conception des figures.

# **Distinct antiviral signaling pathways in primary human hepatocytes and their differential disruption by HCV NS3 protease**

**Loubna Jouan<sup>1,4</sup>, Pierre Melançon<sup>1</sup>, Ian-Gaël Rodrigue-Gervais<sup>1,5</sup>, Valérie-Ann Raymond<sup>2</sup>, Subajini Selliah<sup>2</sup>, Geneviève Boucher<sup>8</sup>, Marc Bilodeau<sup>2,6</sup>, Nathalie Grandvaux<sup>3,7</sup> and Daniel Lamarre<sup>1,6,8</sup> \***

<sup>1</sup> Laboratoire d'immunologie virale, Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), Hôpital Saint-Luc, 264 René Levesque-Est, PEA 312, Montréal, Québec, Canada, H2X 1P1

<sup>2</sup> Laboratoire d'hépatologie cellulaire, Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada, H2X 1P1

<sup>3</sup> Laboratoire de signalisation et infections virales, Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada, H2X 1P1

<sup>4</sup> Département de Sciences Biomédicales, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

<sup>5</sup> Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

<sup>6</sup> Département de Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

<sup>7</sup> Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

<sup>8</sup> Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

**Running title:** Evasion of Innate Immunity by HCV NS3/4A Protease

**\* Corresponding Author:**

Daniel Lamarre, CRCHUM, Hôpital St-Luc, 264 René Levesque-Est, PEA 312, Montréal, Qc, CA, H2X 1P1

Tel: +1 514 890 8000 35258; fax: +1 514 4127314

5132 words, 4 figures, 2 tables, supplemental material and 4 figures.

**Abbreviations:**

HCV, hepatitis C virus; NS3/4A, non structural proteins 3 and 4A; PRR, pathogene recognition receptor; MOI, multiplicity of infection; edsRNA: extracellular double-stranded ribonucleic acid; idsRNA, intracellular double-stranded ribonucleic acid; TLR3, Toll-like receptor 3; RIG-I, retinoic acid inducible gene-I; IFN, interferon; ISG, interferon stimulated gene; ISRE, interferon-stimulated response element.

**Fundings:** The present work was supported by a graduate studentship grant to LJ by the Canadian Liver Foundation and by the Novartis/Canadian Liver Foundation Hepatology Research Chair to DL.

## **Abstract**

**BACKGROUND/AIMS:** Molecular sensors recognize viral nucleic acids and initiate events that subsequently enable cells to control and clear infection. Hepatitis C Virus (HCV) can interfere with the innate host response and the NS3/4A protease was reported to specifically block antiviral signaling pathways, a finding that had yet to be studied in human primary hepatocytes. **METHODS:** Freshly isolated human primary hepatocytes, transduced with a lentiviral vector expressing HCV NS3/4A were stimulated with extracellular and intracellular double-stranded RNA (dsRNA) and the innate immune antiviral genes were quantified by quantitative PCR and microarrays analysis. **RESULTS:** We demonstrate that sensing receptors of human hepatocytes in primary cultures are stimulated following recognition of either mode of dsRNA delivery, inducing transcriptional up-regulation (over 100-fold) of multiple immune genes, either selectively or independently of recognition pathways. We also report that the intracellular dsRNA-activated innate response is severely compromised upon ectopic expression of the HCV NS3/4A protease gene in normal human primary hepatocytes, and completely restored by treatment with the NS3/4A protease specific inhibitor BILN 2061. **CONCLUSIONS:** The present study indicates that NS3/4A has a wider protease-dependent effect on the intracellular Pathogen Recognition Receptor (PRR)-mediated immune response than on its extracellular counterpart, which underlies the major role of cytosolic dsRNA receptors in HCV recognition by primary human hepatocytes.

**Abstract:** 211 words

**Keywords:** Hepatitis C virus; Primary hepatocytes; NS3/4A; Interferon stimulated genes; Viral interference

## Introduction

Hepatitis C virus (HCV), a member of the *Flaviviridae* family, is a serious and growing threat to human health; the majority of HCV-infected individuals develop a persistent infection (1). Chronic infection is established through a high genetic variability of HCV together with several powerful strategies to evade the host's immune response. The immediate-early phase of the host's innate response to viral infections is initiated through recognition of viral RNA by pathogen recognition receptors (PRRs). This subsequently activates transcription factors, such as nuclear factor (NF)- $\kappa$ B and interferon regulatory factor (IRF)-3, that regulate the expression of a set of immediate early protective genes, including antiviral genes such as type I IFN (*IFN* $\alpha$  and  $\beta$ ), interferon stimulated genes (ISGs) (*IFIT1*, *IFIT2* and *IFIT3*), chemokines (*CCL5*) and proinflammatory cytokines (*TNF* $\alpha$ , *IL6*) (25). Among PRRs that recognize viral RNAs, RIG-I and MDA5 both contain the DEXD/H box signature of RNA helicases and two caspase-recruitment and activation domains (CARD) and have been identified as dsRNA cytosolic sentinels (11). In the context of an HCV infection, it was recently proposed that HCV poly-U/UC RNA directs stable interaction with RIG-I in a 5'PPP-dependent manner (23) and induces an activation of its signaling pathway through CARDIF (also referred to as IPS-1, MAVS or VISA), a common adaptor shared by RIG-I and MDA5. Similarly, Toll-like Receptor 3 (TLR3), a membrane-bound receptor which is involved in extracellular and endosomal recognition of dsRNA, ssRNA viruses and poly(I:C), recruits the adaptor TRIF to activate downstream signaling pathways leading to activation of IRF3 and NF- $\kappa$ B (11). However, TLR3's involvement in host defense against HCV remains controversial. HCV NS3/4A protease was shown to inhibit expression of type I IFN and ISGs (3, 9, 10, 16, 18) by cleaving CARDIF at a membrane-proximal site, disrupting its dimerization (2) and causing the loss of downstream signaling activity (16, 17). HCV protease inhibitor BILN2061 was shown to block NS3-mediated polyprotein processing (13). Moreover, CARDIF cleavage by HCV NS3 protease in HCV-infected Huh7 cells is completely abrogated by BILN2061 treatment (4, 18). Additionally, TRIF was shown to be cleaved by purified single chain NS3/4A protease *in vitro* (7, 15), whereas TRIF cleavage



products in HEK 293 cells expressing NS3/4A have not been found. The demonstration by Dansako et al., that the TLR3/TRIF signaling pathway was not affected in the non-neoplastic human hepatocyte PH5CH8 cells expressing NS3/4A, built up the controversy over the veracity of TRIF as a target for HCV protease (5, 6). Antiviral responses have been studied in human hepatic-derived cell lines that often differ from primary cells in their ability to activate antiviral pathways in response to dsRNA or viral infection. Huh7 and its derivative Huh7.5 cells, both widely used as models, are defective in their TLR3 and RIGI signaling pathways, respectively (14, 24). The significance of these studies that decipher various antiviral signaling pathways largely requires validation in primary cultures. In this study, mRNA levels of selected antiviral genes were quantitatively analyzed and global cellular gene expression analysis was performed to characterize dsRNA-activated innate responses in primary cultures of freshly isolated human hepatocytes. We report the upregulation of typical innate immune regulatory genes demonstrating functionality of viral sensing and signaling pathways in human hepatocytes following dsRNA stimulation. Moreover, we confirm the HCV NS3/4A protease-mediated major interference of the intracellular dsRNA-activated signaling pathway upon ectopic expression in primary culture of human hepatocytes, concomitant with a BILN2061-reversible CARDIF proteolytic cleavage.

## Materials and methods

### Patients, cell culture and dsRNA stimulations

Primary cultures of hepatocytes were obtained from healthy peritumoral liver tissues of 17 non-HCV, non-HBV infected patients undergoing partial hepatectomy for secondary metastatic lesions due to colorectal cancers (see Table S1). All procedures followed were in accordance with the ethical commission of the CRCHUM, Montréal, Canada and with the Helsinki Declaration. Biopsy processing, isolation by collagenase perfusion and purification of hepatocytes were carried out as previously described (22). Hepatocytes were seeded and cultured overnight at 500,000 cells ml<sup>-1</sup> in 6 well-plates precoated with rat tail collagen type I (BD Biosciences, Bedford, MA) and used within 16-24 hrs of isolation for stimulations experiments. Cells were stimulated with poly(I:C) (InvivoGen, San Diego CA), for 0-48 hrs at 37°C with either 2-50 µg/ml of poly(I:C) in Opti-MEM (TRIF-dependent) or 0.25-15 µg/ml of poly(I:C) or 0.75 µg/ml *in vitro* transcribed HCV RNA (AB12 plasmid) complexed with Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) in a 1:1 ratio in Opti-MEM (CARDIF-dependent). Poly(I:C) in culture medium was kept during the course of both stimulation experiments.

### Quantitative PCR (qPCR) assays

Total RNA was extracted using Rneasy Mini kit (Qiagen, Mississauga, Ontario) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed on 300 ng total RNA using the QuantiTect RT kit (Qiagen). Real time PCR DNA amplification was performed using SyBRgreen PCR master mix (Qiagen) (see primers in Table S3). Absolute copy numbers were determined on a Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) using standard curves established with 10-fold serial dilutions of pCR2.1-TOPO containing the gene of interest and normalized to *β-actin*.

## **Microarray data analysis**

Microarray experiments were performed using Illumina Human RefSeq-8 BeadChips v2 arrays containing 22,184 probes. Illumina probe data were exported from BeadStudio (version 3) as raw data and were screened for quality. Samples failing visual inspection and control examination were removed. Analysis was performed as detailed in supplemental material.

## **HCV NS3/4A-encoded lentivirus preparation and transduction of human hepatocytes**

The lentiviral vector system was kindly provided by D. Trono (University of Genève, Switzerland). A PCR-amplified full-length NS3/4A genotype 1b was subcloned into pWPI. Production of lentiviruses was performed as described in protocols section at <http://tronolab.epfl.ch/> with one modification: supernatants were concentrated 10-fold with Centricon plus 70 cut-off 100 kDA (Millipore Corporation, Billerica, MA). For transduction of hepatocytes, cells were incubated for 6 hrs with lentivirus preparations (MOI of 2) with 8 µg/ml polybrene. Culture medium was then changed and cells were maintained for 72 hrs in absence or presence of 2 µM of the protease inhibitor BILN2061 (provided by Virochem Pharma, Montréal, Canada) prior to poly(I:C) stimulation.

## **Immunofluorescence**

Hepatocytes were seeded on coverslips precoated with rat tail collagen type I and fixed with formaldehyde 3.8% (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario) in PBS for 15 min at room temperature (RT). After permeabilization with Triton X-100 0.5% (Sigma Aldrich), PBS washes, and blockage with goat serum 10% (Sigma Aldrich) for 1 hour at RT, cells were incubated with anti-NS3 antibody kindly provided by Dr. Moradpour (CHUV, Lausanne, Switzerland). The Tyramide Signal Amplification Kit (Invitrogen) with Alexa Fluor 594 was used and nuclei were stained with DAPI (Invitrogen). Cells were observed with an Axioplan 2 Imaging Universal Microscope (Zeiss, Berlin, Germany).

### **Immunoblot analysis**

Whole-cell extracts were prepared as previously described (8). Membranes were incubated with rabbit anti-CARDIF (Alexis Biochemicals, San Diego, CA), rabbit anti-TRIF (Alexis Biochemicals), monoclonal anti-NS3 (Bioscience Resource Project, Saco, ME) or mouse anti- $\beta$ -actin antibody (Chemicon International, Temecula, CA). After washes, membranes were incubated in HRP-conjugated goat anti-rabbit or HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (KPL, Gaithersburg, MD).

## Results

### **Molecular sensors of extracellular and intracellular dsRNA induce an innate antiviral response in human primary hepatocytes**

Most cultured hepatic cell lines radically differ from their primary counterparts in their ability to respond to both extracellular dsRNA (edsRNA) (TLR viral sensors) and intracellular dsRNA (idsRNA) (cytoplasmic viral sensors), partly due to differences in expression of pathogen recognition receptors (PRRs) (12, 14). In our preparations of human hepatocytes, in which more than 99% of freshly isolated cells positively stained for an hepatocyte antigen by immunofluorescence (see FIG.S1), mRNAs coding for *TLR3*, *IFIH1* (*MDA5*) and *DDX58* (*RIGI*) virus-sensing receptors were detected for up to 4 days in culture under unstimulated conditions (see FIG.S2). This persuaded us to further explore the functionality of viral RNA recognition and the antiviral signaling response in primary cultures of human hepatocytes. In particular, we focused on the detection of the synthetic dsRNA analog poly(I:C) added to the culture medium (edsRNA), a molecule widely used to mimic common viral structures recognized by PRRs such as TLRs. Conditions of edsRNA-induced antiviral responses in hepatocytes were assessed by qPCR analysis of four genes, *IFN $\beta$* , *IFIT1*, *CCL5* and *IL6*, the expressions of which are known to be augmented during response to viral infection. As shown in Figure 1, panels A and B, these genes were all significantly induced in human hepatocytes after a 3-hour exposure to poly(I:C). Dose-dependence analysis indicated that 2  $\mu\text{g/ml}$  extracellular poly(I:C) was sufficient to obtain a significant induction of the representative genes, and that this response reached a plateau at 5  $\mu\text{g/ml}$  of poly(I:C). As shown in panel C, edsRNA treatment induced mRNA levels of *IFIT1* and *CCL5* (4.7 and 3.6 millions of copies/ $\mu\text{g}$  total RNA) that remained constant from 3 to 6 hrs post-stimulation, at which time they began to decrease without reaching basal levels at 48 hours (156,000 and 45,000 copies/ $\mu\text{g}$  total RNA). In contrast, expression of *IFN $\beta$*  showed a maximum induction at 3 hours (55,000 copies/ $\mu\text{g}$  total RNA) that consistently decreased to a non-detectable level by 6 hours,

independently of the concentration of poly(I:C) (2-50  $\mu\text{g/ml}$ ) in the cell culture medium. *IL6* expression was also markedly induced at 3 hours (15,000 and 29,000 copies/ $\mu\text{g}$  total RNA with 2 and 5  $\mu\text{g/ml}$  poly(I:C)) but decreased to basal levels between 6 and 48 hours post-induction.

Liposome-mediated transfection of poly(I:C) allows for idsRNA interaction with cytoplasmic virus-sensing receptors of the RIG-I-like helicase (RLH) family. To evaluate the response to idsRNA in human hepatocytes, we first performed dose-dependence (0.25 to 15  $\mu\text{g/ml}$  poly(I:C)) and kinetic analysis (0 to 48 hours) (Figure 1 D,E). Incubation with 0.25  $\mu\text{g/ml}$  poly(I:C) was sufficient to significantly induce *IFIT1*, *CCL5*, *IFN $\beta$*  and *IL6* mRNA levels and 0.75  $\mu\text{g/ml}$  poly(I:C) induced maximum levels between 6 to 48 hours post-stimulation. The idsRNA response presented this extended lag period and lasted for at least 48 hours, in contrast to the edsRNA response for which the induction of genes was rapid (3 hours) and reached a maximum at 6 hours. Interestingly, a strong induction of *IFN $\beta$*  gene was observed (147,000 copies/ $\mu\text{g}$  total RNA), which drastically differs from the return to basal level obtained 6 hours post-stimulation with edsRNA.

To obtain a more comprehensive view of the changes in human hepatocyte gene expression occurring after each dsRNA treatments, microarray assays were used. The k-means analysis module implemented in the microarray analysis tool MeV (TIGR Multiexperiment Viewer) incorporates algorithms for gene clustering. Overall changes in gene expression following edsRNA stimulation revealed 3 clusters (supplemental figure S3). Cluster 1 regroups 150 probe sets that are greater than 2-fold down-regulated at 3 and 6 hours. Cluster 2 regroups 148 probe sets that are greater than 2-fold upregulated at 3 and 6 hours compared to the unstimulated control. As described in table 1 (left column), cluster 2 includes some common early antiviral genes that were highly induced at 6 hours (90-fold for *IFIT3* (*ISG60*), 71-fold for *IFIT1* (*ISG56*), 59-fold for *OASL*, 25-fold for *IFIT2* (*ISG54*) and 22-fold for *CCL5* (*RANTES*)). Interestingly, *CXCL10* (i.e. *IP-10*) and *CXCL11* (i.e. *IP-9*) were induced by 174- and 109-fold, respectively, at 6 hours. Cluster 3 regroups genes whose expression levels were strongly controlled: upregulated at 3 hours and rapidly downregulated at 6 hours, such as *IFN $\beta$* , *TNFAIP3* and *IL8* (Table 2).

The idsRNA-regulated response of human hepatocytes was organized into 2 clusters (Figure S4). Cluster 1 (right column Table 1) represents genes that are highly upregulated: *IFN $\beta$*  (107-fold) and known ISGs such as *IFIT1* (49-fold), *IFIT2* (78-fold), *IFIT3* (51-fold), and *OASL* (72-fold), whereas cluster 2 regroups genes that are downregulated after dsRNA treatment. As observed following edsRNA stimulation, *CXCL10* and *CXCL11* were strongly upregulated (117- and 119-fold respectively). In contrast, *IL28A*, *IL28B* and *IL29* genes, which belong to the interferon lambda family, were specifically and highly induced after 6 hours of idsRNA treatment (132-, 63- and 52-fold respectively), whereas they were undetectable after edsRNA treatment (left column Table 1). Our results obtained by qPCR for selected genes and by microarray for whole genome analysis demonstrate that edsRNA and idsRNA treatments induce innate immune responses in human hepatocytes with common or specific immune genes depending on the mode of delivery of dsRNA, which contribute to a defense state in these cells.

### **HCV NS3/4A protease cleaves CARDIF and blocks dsRNA-induced antiviral response in primary cultures of human hepatocytes**

To address whether the NS3/4A protease of HCV interferes with antiviral responses and contributes to an immune evasion strategy in human hepatocytes, a lentiviral expression system was used to express full-length NS3/4A protein genotype 1b. This system ensures high viral protein expression within non-proliferating primary cultures of hepatocytes. Control lentiviral particles were shown to have a minimal effect on the induction of selected genes 4 days post-infection (data not shown). As shown in Figure 2A, more than 80% of transduced cells (MOI of 2) positively stained for an anti-NS3 protease monoclonal antibody by immunofluorescence. The catalytic activity of the protease was confirmed by Western blot analysis as shown by the processed NS3 protein detected with an apparent molecular weight of 70kDa (Figure 2B). Treatment of cells with the NS3 protease inhibitor BILN2061 resulted in the detection of the expected higher molecular weight product corresponding to the non-cleaved NS3/4A protein, and further confirmed the catalytic activity of

ectopically expressed NS3/4A protease. Using transduced cells, we demonstrated that HCV NS3/4A protease is able to cleave CARDIF in human hepatocytes, independently of stimulation with poly(I:C) or HCV RNA (Figure 2C). Furthermore, the NS3/4A protease-dependent cleavage of CARDIF was reversed by treatment with the specific NS3/4A inhibitor BILN2061. However, we did not observe either cleavage or diminution of TRIF with expression of NS3/4A protease. Following the confirmation of CARDIF cleavage in NS3/4A-expressing hepatocytes, we investigated the ability of the protease to interfere with the idsRNA-activated antiviral response. The idsRNA-induced *IFN $\beta$* , *IFIT1*, *CCL5* and *IL6* mRNA levels were strongly decreased in NS3/4A protease-expressing hepatocytes compared to stimulated controls (Figure 3A, B, C and D, right sections). Addition of BILN2061 abrogated the interfering effect of NS3/4A protease and restored idsRNA-induced mRNA levels to those observed in stimulated controls. We also investigated the ability of NS3/4A protease to interfere with edsRNA-activated TRIF-dependent antiviral response in NS3/4A protease-expressing cells (Figure 3A, B, C and D, left sections). However, we observed a significant decrease in mRNA levels of *IFN $\beta$* , *CCL5* and *IL6*, but not *IFIT1*, within 3 to 6 hours of edsRNA stimulation in NS3/4A-expressing hepatocytes as compared to control cells. Surprisingly, addition of BILN2061 did not restore the mRNA levels to those of control stimulated cells. These results demonstrate that HCV NS3/4A preferentially targets the idsRNA-activated antiviral response, and can interfere with the edsRNA-activated response in a protease-independent manner.

### **Transcriptomal analysis of NS3/4A-mediated interference of TRIF and CARDIF-dependent pathways**

In order to examine the interfering effect of NS3/4A in blocking host innate antiviral response pathways, microarray analysis was used to compare global gene expression in stimulated human hepatocytes expressing NS3/4A or the empty lentiviral control in the presence or absence of BILN2061. From the analysis of transduced hepatocytes, 150 and 42 genes were identified to be



upregulated with a minimum fold-increase of 3.5 after edsRNA and idsRNA treatments, respectively. To gain insight into the effect of NS3/4A expression on these genes, we calculated fold induction relative to their expression in the presence of the empty vector. The 25 most affected genes following either dsRNA treatments of hepatocytes expressing NS3/4A protease are listed in Figure 4, and their fold activation were compared to activation in the presence of BILN2061 (red vs. blue bars). Following edsRNA treatment (Figure 4A), only two of the 25 most affected genes were inhibited by more than 50% with expression of NS3/4A. In addition, none of the top-25 genes were restored to control levels after BILN2061 treatment. In sharp contrast, 15 genes were inhibited by more than 50% with expression of NS3/4A after idsRNA treatment, and all gene inhibition was completely reversed by the presence of BILN2061 (Figure 4B). On the top-25 affected genes, we performed a gene ontology analysis that searches in a given list of genes for enriched biological themes (using DAVID Bioinformatics Resources facilities). In the case of edsRNA treatment, we found that ten of the 25 are related to the immune response process with an ease score (modified Fisher exact p-value) of  $1.0E-06$ . The pathway analysis revealed that the two most implicated networks are “cytokine-cytokine receptor interaction” (ease score of  $3.2E-07$ ) and “Toll-like receptor signaling pathway” (ease score of  $1.1E-02$ ). In the case of idsRNA treatment, the top-25 genes are highly related to the “response to virus” with an ease score of  $2.6E-13$  and to the “cytokine-cytokine receptor interaction” pathway with an ease score of  $2.3E-08$ . Altogether, our data show that expression of NS3/4A in human hepatocytes interferes with idsRNA sensing pathways in a protease-dependent manner whereas the edsRNA mediated pathway is subverted by a catalytically inactive NS3/4A protease.

## Discussion

In an effort to understand how HCV evades the antiviral response and innate immunity, various hepatic cell lines, either carcinoma-derived or immortalized, were used to characterize the responses to viral infection. In order to unravel the interactions between HCV and the effective antiviral response conducted by its major target -the human hepatocytes-, a better understanding of the functionality of TLR and cytosolic receptor CARDIF-mediated pathways in highly pure primary cultures of human hepatocytes is essential. By using quantitative PCR and microarray assays, we demonstrate that human hepatocytes are able to rapidly induce an antiviral immune response characterized by the transcription of early ISGs (*IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*,...), chemokines (*CCL5*, *CXCL10*, *CXCL11*,...) and proinflammatory cytokines (*IL6*, *TNF $\alpha$* ...) following recognition of both edsRNA and idsRNA. Furthermore, the observed differential kinetics and gene induction with both stimulations demonstrated the existence of two distinct sensing and signaling pathways. Although we cannot completely exclude that incubation of poly(I:C) in lipoplexes activates the edsRNA-mediated pathway, however, we can rule out any stimulation of the idsRNA-mediated pathway upon edsRNA-mediated activation (*IL28A*, *IL28B* and *IL29* genes are not induced after edsRNA treatment). In addition, the fact that edsRNA-induced response of target genes was partially affected by NS3/4A expression, in contrast to the idsRNA-induced response that is greatly affected and selectively restored by inhibiting protease activity, further demonstrates distinct signaling pathways. Interestingly, the fact that IFN $\lambda$  is highly induced in human primary hepatocytes after idsRNA challenge justified the rationale of IFN $\lambda$  as a therapy for HCV infection, in addition to its ability to inhibit various HCV genotypes in culture and its higher tolerability due to a more restricted IFN $\lambda$  receptor distribution (19).

The HCV NS3/4A protease can disrupt antiviral signaling in various hepatic cell lines; however, whether it mediates evasion of innate immunity in primary human hepatocytes was unknown. Both TRIF and CARDIF adaptors of antiviral signaling pathways were identified as cellular substrates of

HCV NS3/4A protease (3, 4, 15-18, 20, 27). In our study, we demonstrated preferential abrogation of the idsRNA-induced pathway with the ectopic expression of HCV NS3/4A protease leading to reduced gene induction and CARDIF cleavage in primary hepatocytes. We confirmed the drastic interference of a number of idsRNA-induced genes by microarray analysis of protease-expressing hepatocytes, which include *IFN $\lambda$ <sub>1,2,3</sub>*, *IFN $\beta$* , *OASL*, *CXCL10*, *GIP2*, *CCL5* and *DDX58*. The specific antiviral inhibitor BILN2061 blocked the NS3-mediated cleavage of CARDIF and completely restored the idsRNA-activated antiviral response. In our model, we report the absence of TRIF cleavage with expression of NS3/4A protease in primary hepatocytes confirming the findings in PH5CH8 cells (5, 6). However, we clearly demonstrate a NS3/4A-mediated defect of TLR3-mediated pathway, albeit in a protease-independent manner, which is distinct from its effect on the CARDIF-mediated pathway. That is to say, the subversion effect on the edsRNA treatment in the presence of BILN2061, i.e. upon lower protein expression, is maintained. Unfortunately, we cannot rule out the involvement of its catalytic activity due to the presence of a sub-population of BILN2061-resistant NS3 protease. Alternatively, NS3/4A could target in a protease-independent manner a yet unidentified adaptor specific to the TLR3. Interestingly, during the revision process of our manuscript, a disruption of TLR3 signaling concordant with a reduction of TRIF abundance in HCV-infected Huh7.5-TLR3 cells, partially restored by a specific NS3/4A inhibitor was demonstrated (27). In our study, we can not rule out that a differential localization of the ectopically expressed NS3/4A protein in the absence of a viral replication complex could result in an attenuated or absent cleavage of TRIF.

Besides confirming the lack of restoration of gene induction by BILN2061, our ongoing studies with whole-genome expression profiling of edsRNA activated hepatocytes revealed differential upregulation of apoptosis mediators in the presence of NS3/4A (data not shown), which could contribute to viral persistence and the development of hepatocarcinoma. This is particularly interesting in light of a previous study demonstrating NS3 induced-apoptosis through the caspase-8 pathway (21) and the more recent observation that Huh 7.5 cells infected with JFH1 are sensitized

to apoptosis hence contributing to liver disease progression (26). The attenuation of liver regeneration by TLR3 signaling (28) and the fact that NS3/4A has the ability to modulate this pathway could reveal a series of novel virus-host interactions with potential for therapeutic advances.

In conclusion, we clearly demonstrate that primary cultures of human hepatocytes express dsRNA sensing receptors and are able to induce an innate antiviral immune response following stimulation with edsRNA and idsRNA. Also, the NS3/4A protease, when expressed in normal human hepatocytes, has the ability to preferentially interfere with the host's antiviral response through idsRNA-mediated pathway blockade, inducing a strong inhibition of ISGs expression that is restorable by protease inhibition. However, the NS3/4A effect observed following TLR3-dependent pathway activation raises the interesting possibility of identifying novel virus-host cell interactions associated to liver disease in HCV infection.

## **Acknowledgments**

We thank Laurent Chatel-Chaix for his scientific comments and discussions, Hawley Rigsby for reviewing the manuscript, Rafick-Pierre Sekaly for the collaboration on gene chip studies and, more specifically, members of his group: Nadia Kettaf for Microarrays processing and Ali Filali for statistical assistance. We thank Didier Trono (University of Geneva) for the lentiviral-based expression vectors (pWPI, psPAX2 and pMD2G) and Virochem Pharma Inc for providing HCV protease inhibitor BILN2061.

## Figures Legends

### **Figure 1: Functionality of extracellular and intracellular dsRNA-activated pathways in primary human hepatocytes**

Primary human hepatocytes were treated with edsRNA and idsRNA (polyI:C) for the indicated times and amounts. *IFIT1*, *CCL5*, *IFN $\beta$*  and *IL6* mRNAs were measured by quantitative RT-PCR analysis. The absolute copy number of target genes was normalized on  *$\beta$ -actin*. (A) Increasing amounts of poly(I:C) were added to the culture medium for 3hrs or (B) 6hrs. (C) Poly(I:C) (5  $\mu$ g/ml) was added to the culture medium for various times. (D) Increasing amounts of poly(I:C) complexed with Lipofectamine 2000 were added for 6hrs. (E) Poly(I:C) (0.75 $\mu$ g) complexed to Lipofectamine 2000 was added to cells for various times. These experiments were conducted with six different primary hepatocyte preparations and data from a representative experiment are shown.

### **Figure 2: Endogenous CARDIF but not TRIF cleavage after HCV NS3/4A protease expression by lentiviral-transduced primary human hepatocytes**

(A) Human hepatocytes were infected with empty or NS3/4A expressing lentiviral vector. Cells were stained with anti-NS3 antibody (red), nuclei by DAPI (blue) and examined by fluorescence microscopy with 100X magnification. (B) Total proteins were analyzed by immunoblotting using an anti-NS3 antibody in the absence or presence of BILN2061 (2 $\mu$ M). (C) Differentially stimulated lentiviral-transduced hepatocytes protein extracts were analyzed by immunoblotting with polyclonal anti-TRIF, anti-CARDIF or anti-NS3 antibodies in the absence or presence of BILN2061. These experiments were conducted with six hepatocyte preparations and data from a representative experiment, immunofluorescent assay and immunoblots are shown.

### **Figure 3: Impairment of intracellular dsRNA-activated signaling following ectopically expressed NS3/4A HCV protease in primary human hepatocytes**

Primary hepatocyte preparations (n=6) were transduced with an empty or HCV NS3/4A-expressing lentiviral vector in the absence or presence of BILN2061 (2 $\mu$ M). Cells were treated with 5 $\mu$ g/ml extracellular poly(I:C) (edsRNA) or 0.75 $\mu$ g/ml intracellular poly(I:C) (idsRNA). mRNA levels of *IFN $\beta$*  (A), *IFIT1* (B), *CCL5* (C) and *IL6* (D) were determined by qRT-PCR. For *IFN $\beta$*  and *IL6*, edsRNA was added for 3hrs and idsRNA for 6hrs. For *CCL5* and *IFIT1*, edsRNA and idsRNA were added for 6hrs. Graphs represent relative means  $\pm$  SED of gene expression (experimental conditions over control empty vector). Statistical comparisons between groups were calculated by one-way ANOVA with Tukey's test.

### **Figure 4: Top-25 most affected genes following dsRNA stimulation of primary hepatocytes expressing NS3/4A in the absence or presence of BILN2061**

862 genes (A) and 665 genes (B) were differentially regulated in the presence of NS3/4A (fold induction  $\geq +2$  or  $\leq -2$ ) after 6hrs of edsRNA or idsRNA treatment respectively. NS3/4A interference was calculated on selected upregulated genes (fold induction  $\geq 3.5$ ). Top-25 genes obtained are listed by decreasing interference calculated relative to their expression in the presence of the empty vector and in the presence (blue bars) or absence (red bars) of BILN2061.

## References

1. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007 May 7;13(17):2436-2441.
2. Baril M, Racine ME, Penin F, Lamarre D. MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of HCV NS3/4A protease. *J Virol* 2008 Nov 26.
3. Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, Akira S, Yoneyama M, et al. Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *J Virol* 2005 Apr;79(7):3969-3978.
4. Cheng G, Zhong J, Chisari FV. Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 May 30;103(22):8499-8504.
5. Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch Virol* 2009 Apr 8.
6. Dansako H, Ikeda M, Kato N. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. *FEBS J* 2007 Aug;274(16):4161-4176.
7. Ferreon JC, Ferreon AC, Li K, Lemon SM. Molecular determinants of TRIF proteolysis mediated by the hepatitis C virus NS3/4A protease. *J Biol Chem* 2005 May 27;280(21):20483-20492.
8. Fink K, Duval A, Martel A, Soucy-Faulkner A, Grandvaux N. Dual role of NOX2 in respiratory syncytial virus- and sendai virus-induced activation of NF-kappaB in airway epithelial cells. *J Immunol* 2008 May 15;180(10):6911-6922.
9. Foy E, Li K, Sumpter R, Jr., Loo YM, Johnson CL, Wang C, et al. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Feb 22;102(8):2986-2991.
10. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Jr., Ikeda M, Lemon SM, et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003 May 16;300(5622):1145-1148.
11. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008 Nov;1143:1-20.
12. Keskinen P, Nyqvist M, Sareneva T, Pirhonen J, Melen K, Julkunen I. Impaired antiviral response in human hepatoma cells. *Virology* 1999 Oct 25;263(2):364-375.
13. Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 2003 Nov 13;426(6963):186-189.
14. Li K, Chen Z, Kato N, Gale M, Jr., Lemon SM. Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *J Biol Chem* 2005 Apr 29;280(17):16739-16747.
15. Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, et al. 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* 2005 Feb 22;102(8):2992-2997.
16. Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Dec 6;102(49):17717-17722.
17. Lin R, Lacoste J, Nakhaei P, Sun Q, Yang L, Paz S, et al. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J Virol* 2006 Jun;80(12):6072-6083.

18. Loo YM, Owen DM, Li K, Erickson AK, Johnson CL, Fish PM, et al. Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Apr 11;103(15):6001-6006.
19. Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kotenko SV, MacDonald MR, et al. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 2006 Dec;131(6):1887-1898.
20. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005 Oct 20;437(7062):1167-1172.
21. Prikhod'ko EA, Prikhod'ko GG, Siegel RM, Thompson P, Major ME, Cohen JI. The NS3 protein of hepatitis C virus induces caspase-8-mediated apoptosis independent of its protease or helicase activities. *Virology* 2004 Nov 10;329(1):53-67.
22. Raymond VA, Selliah S, Ethier C, Houle R, Jouan L, Maniere T, et al. Primary cultures of human hepatocytes isolated from hepatitis C virus-infected cirrhotic livers as a model to study hepatitis C infection. *Liver Int* 2009 Mar 3.
23. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M, Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 2008 Jul 24;454(7203):523-527.
24. Sumpter R, Jr., Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, et al. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 2005 Mar;79(5):2689-2699.
25. Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* 2009 Jan;227(1):75-86.
26. Walters KA, Syder AJ, Lederer SL, Diamond DL, Paepfer B, Rice CM, et al. Genomic analysis reveals a potential role for cell cycle perturbation in HCV-mediated apoptosis of cultured hepatocytes. *PLoS Pathog* 2009 Jan;5(1):e1000269.
27. Wang N, Liang Y, Devaraj S, Wang J, Lemon SM, Li K. Toll-like Receptor 3 Mediates Establishment of an Antiviral State Against Hepatitis C Virus in Hepatoma Cells. *J Virol* 2009 Jul 22.
28. Zorde-Khvaleyevsky E, Abramovitch R, Barash H, Spivak-Pohis I, Rivkin L, Rachmilewitz J, et al. Toll-like receptor 3 signaling attenuates liver regeneration. *Hepatology* 2009 Mar 19.



**Table 1:** Summary of microarray results showing fold increases in gene expression after extracellular and intracellular dsRNA challenges in freshly purified primary human hepatocytes

Gene symbol	Gene synonym	Gene ID	Fold increase in gene expression <sup>a</sup>	
			edsRNA <sup>b</sup>	idsRNA <sup>c</sup>
CXCL10	IP-10	3627	174	117
IL28A	IFN- $\lambda$ 2	282616	1	132
CXCL11	IP-9	6373	109	119
IFN $\beta$	IFNB1	3456	1	107
IL28B	IFN- $\lambda$ 3	282617	1	63
IL29	IFN- $\lambda$ 1	282618	1	52
IFIT3	ISG60	3437	90	51
F12	HAF	2161	83	1
IFIT1	ISG56	3434	71	49
OASL	TRIP14	8638	59	72
RSAD2	Viperin	91543	46	34
CCL4L1	MIP-1- $\beta$	9560	38	41
CCL3L3	SCYA3L	414062	38	32
CCL3	MIP-1-A	6348	32	25
CCL3L1	MIP-1-AP	6349	29	26
IFIT2	ISG54	3433	25	78
CCL5	RANTES	6352	22	70
GBP4	MPA2	115361	18	26
IFI44	P44	10561	18	14
OAS2	2-5A synthetase	4939	15	17
EPSTI1	BRESI 1	94240	15	16
ZC3HAV1	ZAP	56829	13	12
HERC6	FLJ20637	55008	12	9
CXCL9	MIG	4283	11	67
CX3CL1	Neurotactin	6376	11	11
IFI44L	C10RF29	10964	10	18
ISG15	G1P2	9636	9	12
DDX58	RIGI	23586	8	10
DHX58	LGP2	79132	6	15
IFIH1	MDA5	64135	5	12
SOCS1	TIP3	8651	4	16
SPRY1	-	10252	3	16
BATF2	-	116071	5	15
GBP5	-	115362	5	13
RTP4	IFRG28	64108	5	12
TNFSF10	TRAIL	8743	5	10
IGFBP6	-	3489	4	10
HERC5	CEBP1	51191	4	15
FZD4	CD344	8322	4	10
APOL1	-	8542	3	14
PLEKHA4	PEPP1	57664	2	21
EGR1	ZNF225	1958	-1	14
BCAT2	PP18	587	-1	12

<sup>a</sup> Fold inductions are calculated compared to the non-treated control and filtered to obtain value  $\geq 10$  in one of both conditions after 6 hrs dsRNA treatment, <sup>b</sup> Extracellular dsRNA, <sup>c</sup> Intracellular dsRNA

**Table 2:** Major strongly regulated genes in primary human hepatocytes after extracellular dsRNA challenge as obtained by microarrays analysis

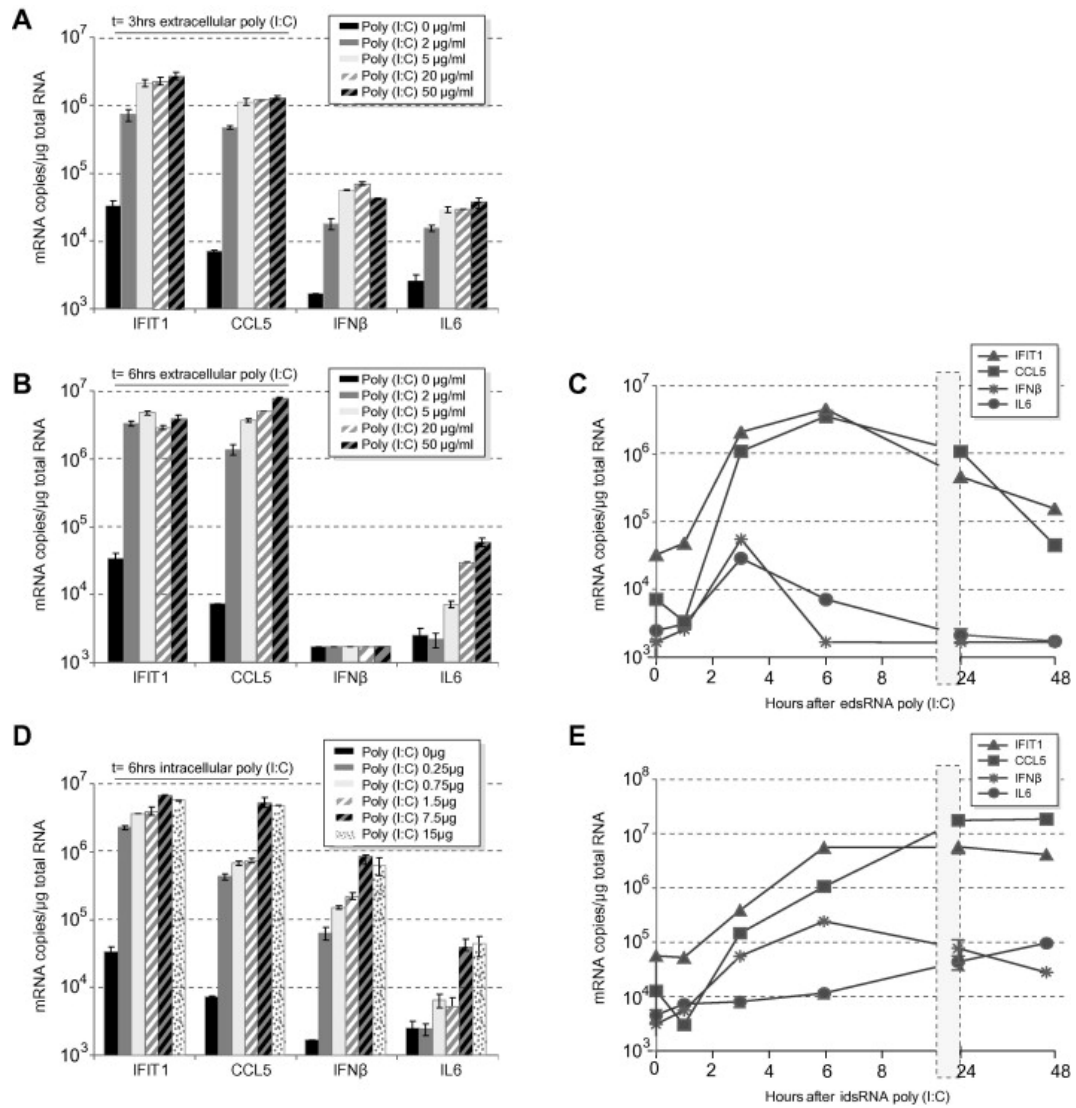
Gene symbol	Gene synonym	Gene ID	Fold increase in gene expression <sup>a</sup>	
			3 h edsRNA <sup>b</sup>	6 h edsRNA <sup>c</sup>
IL-8	CXCL8	3576	7	3
TNFAIP3	A20	7128	6	2
THBS1	TSP	7057	4	1
IFN $\beta$	IFNB1	3456	3	1

<sup>a</sup>Fold inductions are calculated compared to the non-treated control and filtered to obtain 3hrs-stimulated genes  $\geq$  6hrs-stimulated genes after 6 hrs dsRNA treatment

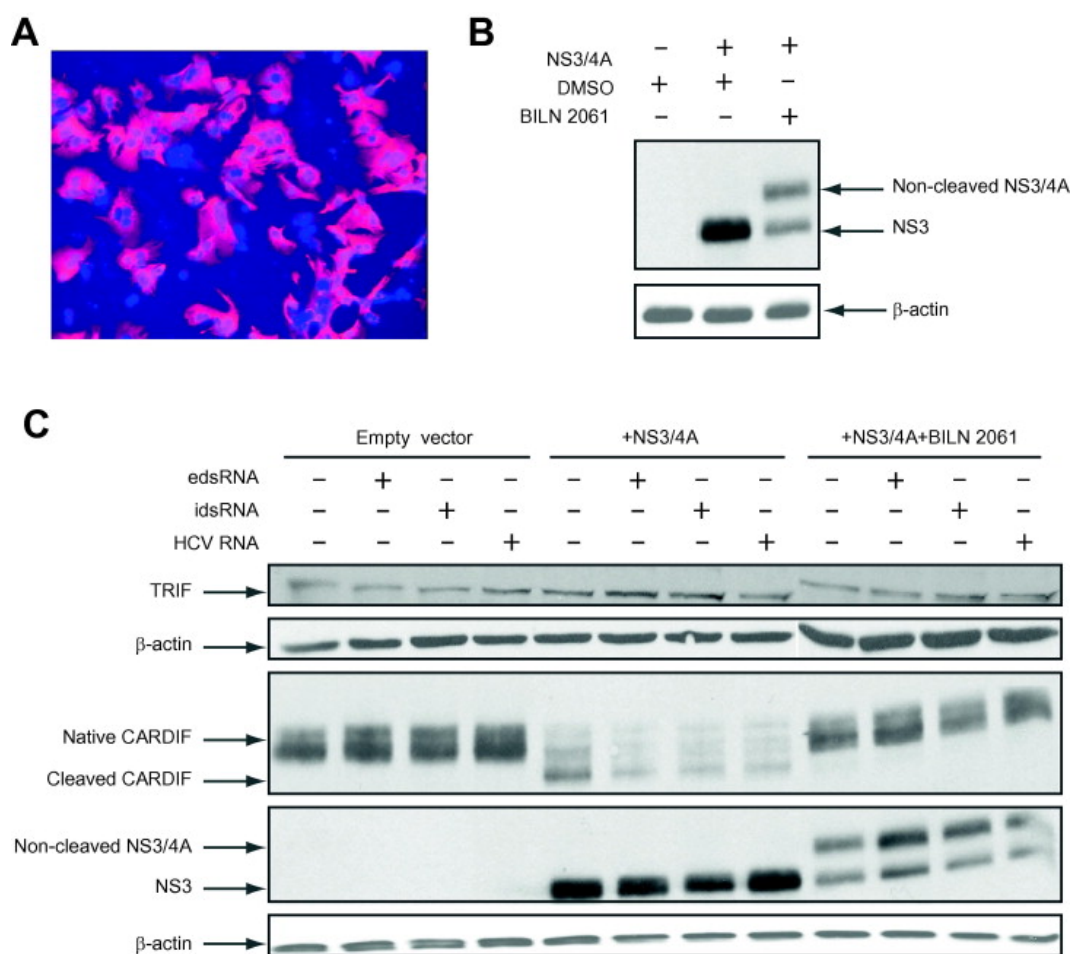
<sup>b</sup> 3hrs-extracellular dsRNA treatment

<sup>c</sup> 6hrs-extracellular dsRNA treatment

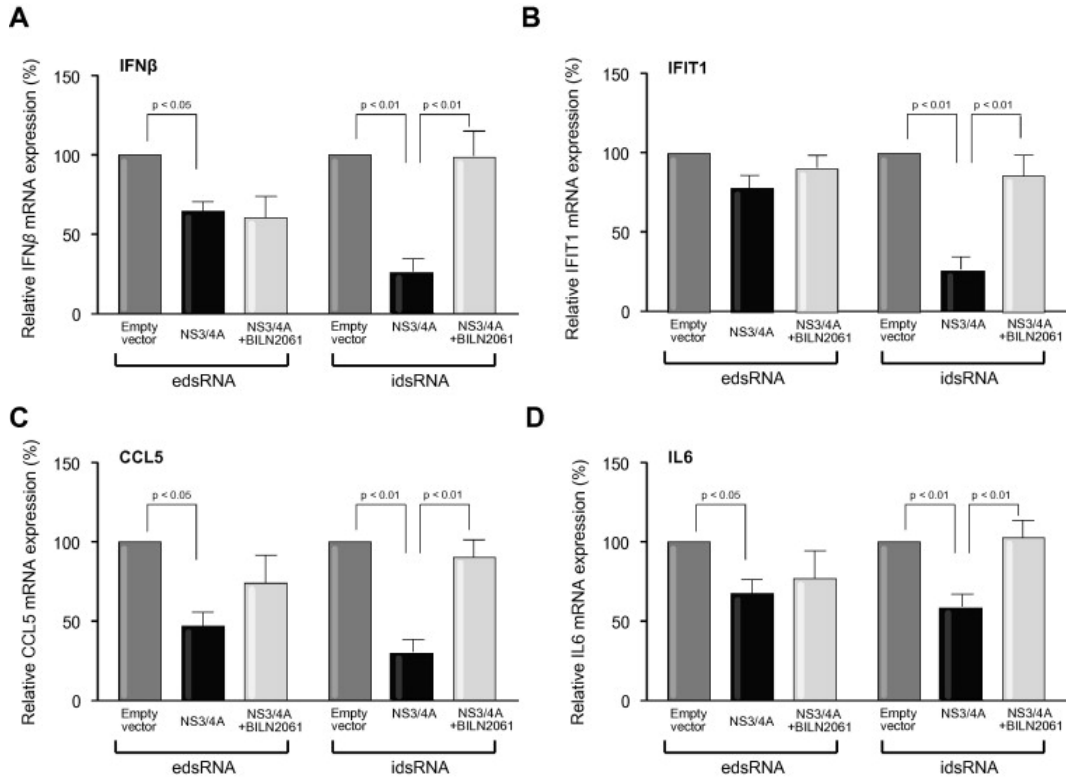
**Figure 1:** Functionality of extracellular and intracellular dsRNA-activated pathways in primary human hepatocytes



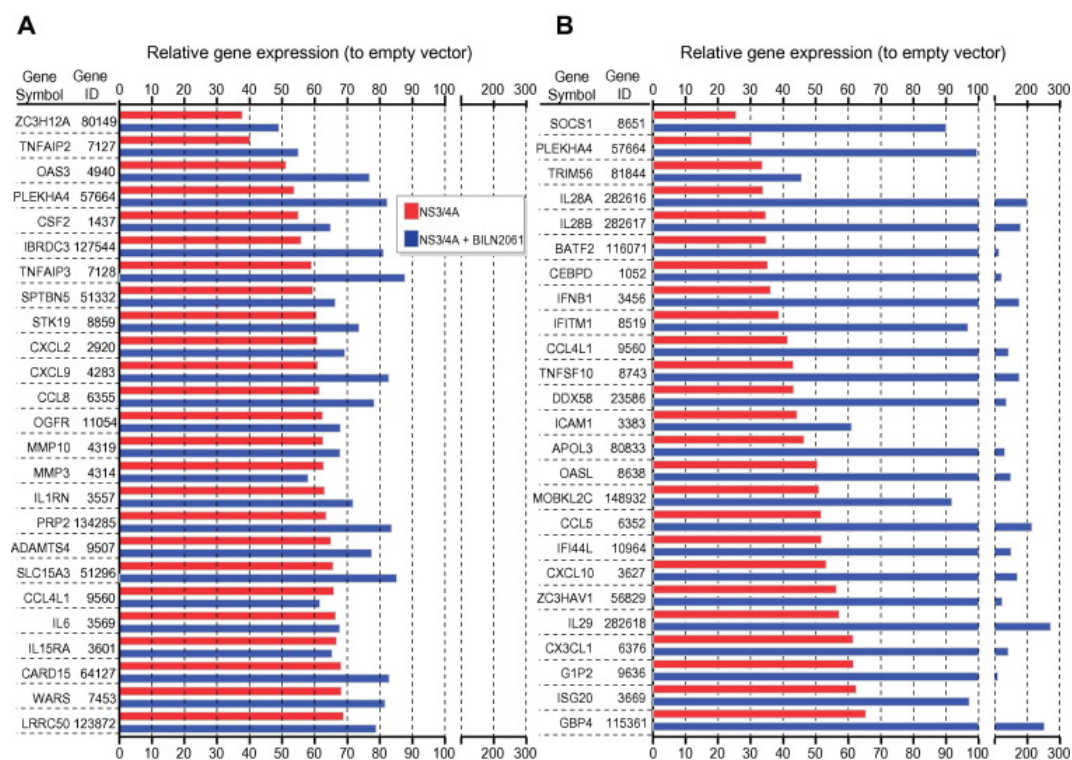
**Figure 2:** Endogenous CARDIF but not TRIF cleavage after HCV NS3/4A protease expression by lentiviral-transduced primary human hepatocytes



**Figure 3:** Impairment of intracellular dsRNA-activated signaling following ectopically expressed NS3/4A HCV protease in primary human hepatocytes



**Figure 4:** Top-25 most affected genes following dsRNA stimulation of primary hepatocytes expressing NS3/4A in the absence or presence of BILN2061



## Supplemental Material and Methods

### Microarray data analysis

Gene expression data was analyzed using Bioconductor, an open-source software library for the analyses of genomic data based on R, a language and environment for statistical computing and graphics ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). The R software package was used to quartile-normalize the probe intensities and to minimum-replace (a surrogate-replacement policy) values below background using the mean background value of the probe controls determined from the microarray quality controls. Bioconductor's *genefilter* package was used to filter out genes with low expression and genes with insufficient variation in expression across all samples tested. Expression values retained after this filtering process presented intensities greater than 100 U (arbitrary units) in at least two samples and a log base 2 scale of at least 0.3 for the interquartile range across all tested samples. The resulting matrix, showing filtered probes (6934) as rows and samples (48) as columns, was used as input for linear modeling using Bioconductor's *limma* package, which estimates the fold-change between predefined groups by fitting a linear model and using an empirical Bayes method to moderate standard errors of the estimated log-fold changes in expression values from each probe set. *P* values from the resulting comparison were adjusted for multiple testing according to the method of Benjamini and Hochberg. This method controls the false discovery rate, which was set to 0.05 in this analysis. K-means clustering analyses were performed on Z-value transformed data with the MeV software (version 4.2.01) of the TM4 suite (<http://www.tm4.org/mev.html>) using Euclidean distance.

### PCR assays

For Figure S2, PCR assays were performed in a T Gradient Cycloer (Biometra, Goettingen, Germany) and cycle numbers were adjusted to end within a linear phase of amplification. Patient's target genes RNA quantities were normalized to concurrently quantified *GAPDH* gene expression.

PCR products were subjected to electrophoresis on 1% agarose gels and stained with ethidium bromide. Stained gels were captured on a Gel Doc 2000 CCD RS-170 digital camera (Bio-Rad Laboratories Ltd, Mississauga, Ontario) and analyzed with Quantity One Quantification software (Bio-Rad Laboratories, Ltd).



## Supplemental Legends

### **Figure S1: Characterization of freshly isolated hepatocyte preparations.**

Normal primary human hepatocytes were isolated from a peritumoral liver resection specimen and were seeded for 4 days in eight-chamber slides precoated with collagen at a density of 100 000 cells/well. The cells were processed for immunostaining with monoclonal Mouse anti-human Hepatocyte antibody (Clone OCH1E5) (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). The second antibody is an anti-mouse Alexa 488 (green signal) antibody. Nuclei were stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue signal). Analysis was performed by fluorescence microscopy with 100X magnification and shows complete fields of primary hepatocytes. An occasional cluster of non-parenchymal cells that are not stained by the antibody is showed in red.

### **Figure S2: Expression of innate immune sensors TLR3, MDA5 and RIGI in normal primary human hepatocytes.**

Normal hepatocytes were isolated and maintained in culture for 4 days. Total RNA was extracted and subjected to reverse transcription as described in Material and Methods. Semi-quantitative RT-PCR detection of *TLR3*, *IFIH1* (*MDA5*) and *DDX58* (*RIGI*) mRNAs were performed with 3 normal (HN P, HN Q and HN O) hepatocyte preparations. *Alb* coding for Albumin was used as a specific marker for adult differentiated human hepatocytes and *GAPDH* to normalize.

### **Figure S3: Overall changes in gene expression in primary human hepatocytes after extracellular dsRNA treatment can be grouped in 3 different clusters.**

(left) Heat maps are produced by k-means clustering of extracellular dsRNA-stimulated primary hepatocytes gene profiles. This analytical method was used to group genes with similar expression patterns. The complete output of each k-means cluster analysis is shown. Data was gene/row normalized (z-score transformation) to allow visual display of expression level differences. Red

color indicates an increased relative abundance of the transcript at the indicated time compared to the mean expression of the gene, whereas green indicates a decreased relative abundance according to the scale shown. Individual genes are represented along the vertical axis whereas the experimental conditions done in duplicates (i.e., untreated control (t0), extracellular dsRNA (poly(I:C) 3hrs (MIC3) and 6hrs (MIC6)) are represented horizontally. (right) The mean expression pattern for the genes in each cluster was calculated. The y-axis unit is z scores, indicating the relative expression over time. The number of probes in each cluster is indicated in each box. Cluster 1 regroups downregulated genes at 3 and 6hrs post-stimulation, whereas upregulated genes at 3 and 6hrs fall in cluster 2. More strongly regulated genes, such as upregulated genes at 3hrs but downregulated at 6hrs were found in cluster 3.

**Figure S4: Overall changes in gene expression in human primary hepatocytes after intracellular dsRNA treatment can be grouped in 2 different clusters.**

(left) Heat maps are produced by k-means clustering of intracellular dsRNA-stimulated primary hepatocytes gene profiles. This analytical method was used to group genes with similar expression patterns. The complete output of each k-means cluster analysis is shown. Data was gene/row normalized (z-score transformation) to allow visual display of expression level differences. Red color indicates an increased relative abundance of the transcript at the indicated time compared to the mean expression of the gene, whereas green indicates a decreased relative abundance according to the scale shown. Individual genes are represented along the vertical axis whereas the experimental conditions done in duplicates (i.e., untreated control (t0), intracellular dsRNA (poly(I:C) 6hrs (LIC6)) are represented horizontally. (right) The mean expression pattern for the genes in each cluster was calculated. The y-axis unit is z scores, indicating the relative expression over time. The number of probes in each cluster is indicated in each box. Cluster 1 regroups downregulated genes at 6hrs post-stimulation, whereas upregulated genes at 6hrs fall in cluster 2.

**Supplemental table S1:** Demographic characteristics of non-infected patients

<b>Livers ID</b>	<b>Age (years)</b>	<b>Gender<sup>a</sup></b>
HN B	33	<i>F</i>
HN E	67	<i>M</i>
HN F1	73	<i>M</i>
HN F2	47	<i>M</i>
HN G	66	<i>M</i>
HN I	58	<i>M</i>
HN J	66	<i>M</i>
HN K	55	<i>M</i>
HN L	56	<i>F</i>
HN M	73	<i>M</i>
HN N	44	<i>M</i>
HN O	34	<i>F</i>
HN P	76	<i>F</i>
HN Q	67	<i>M</i>
HN R	74	<i>F</i>
HN S	NA	<i>NA</i>
<i>HN T</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>

<sup>a</sup> Abbreviations: M, male; F, female

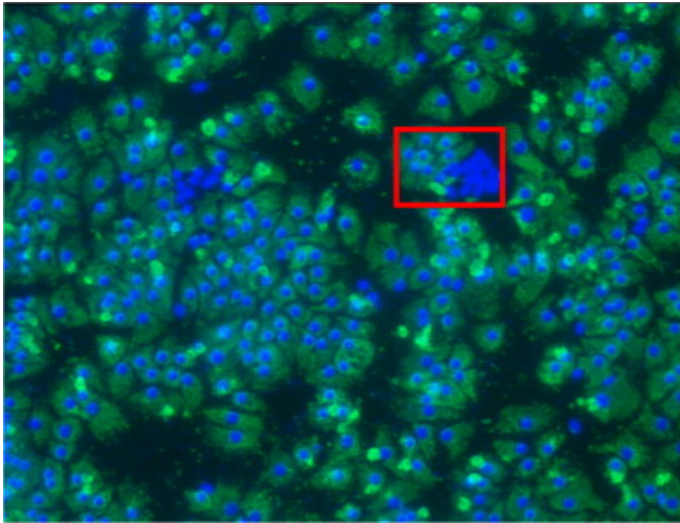
**Supplemental table S2:** Oligonucleotide sequences used for semi-quantitative PCR

Primers	Sequences (5'-3')	PCR Conditions	
		Annealing temperature (°C)	Cycle number
<b>GAPDH FOR</b>	GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG	60	27
<b>GAPDH REV</b>	CCCTTCATTGACCTCAACTACATG GT		
<b>TLR3 ANTISENSE</b>	CAGTCAAATTCGTGCAGAAGGC	55	33
<b>TLR3 SENSE</b>	AGCCACCTGAAGTTGACTCAGG	56	38
<b>RIG I FOR</b>	GACTGGACGTGGCAAAACAA		
<b>RIG I REV</b>	TTGAATGCATCCAATATACACTTC TG		
<b>MDA 5 FW</b>	AGTTTGGCAGAAGGAAGTGTC	58	38
<b>MDA 5 RV</b>	GGAGTTTTCAAGGATTTGAGC		
<b>ALBUMIN FOR</b>	AAGATGACAACCCAAACC	55	25
<b>ALBUMIN REV</b>	ATCAGCACATTCAAGCAG		

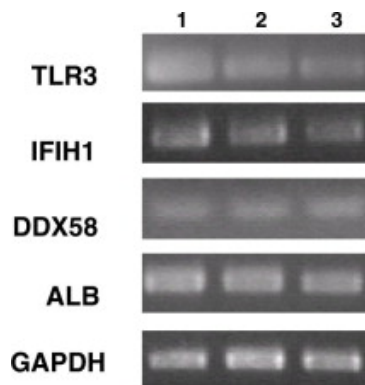
**Supplemental table S3:** Oligonucleotide sequences used for quantitative PCR

Primers	Sequences (5'-3')	PCR Conditions	
		Annealing temperature (°C)	Acquisition temperature (°C)
<b>B-ACTIN FOR</b>	GACTTCGAGCAAGAGATGG	55	84
<b>B-ACTIN REV</b>	AGCACTGTGTTGGCGTACAG		
<b>IFN +</b>	GAACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGC	65	79
<b>IFN -</b>	GTCCTTAGGATTTCCACTCTGACTATGGTCC		
<b>ISG56 FOR</b>	GCCCAGACTTACCTGGACAA	60	79
<b>ISG56 REV</b>	GGTTTTCAGGGTCCACTTCA		
<b>RANTES FOR</b>	TACCATGAAGGTCTCCGC	60	84
<b>RANTES REV</b>	GACAAAGACGACTGCTGG		
<b>IL6 FW</b>	CCACACAGACAGCCACTCAC	62	79
<b>IL6 RV</b>	AGGTTGTTTTCTGCCAGTGC		

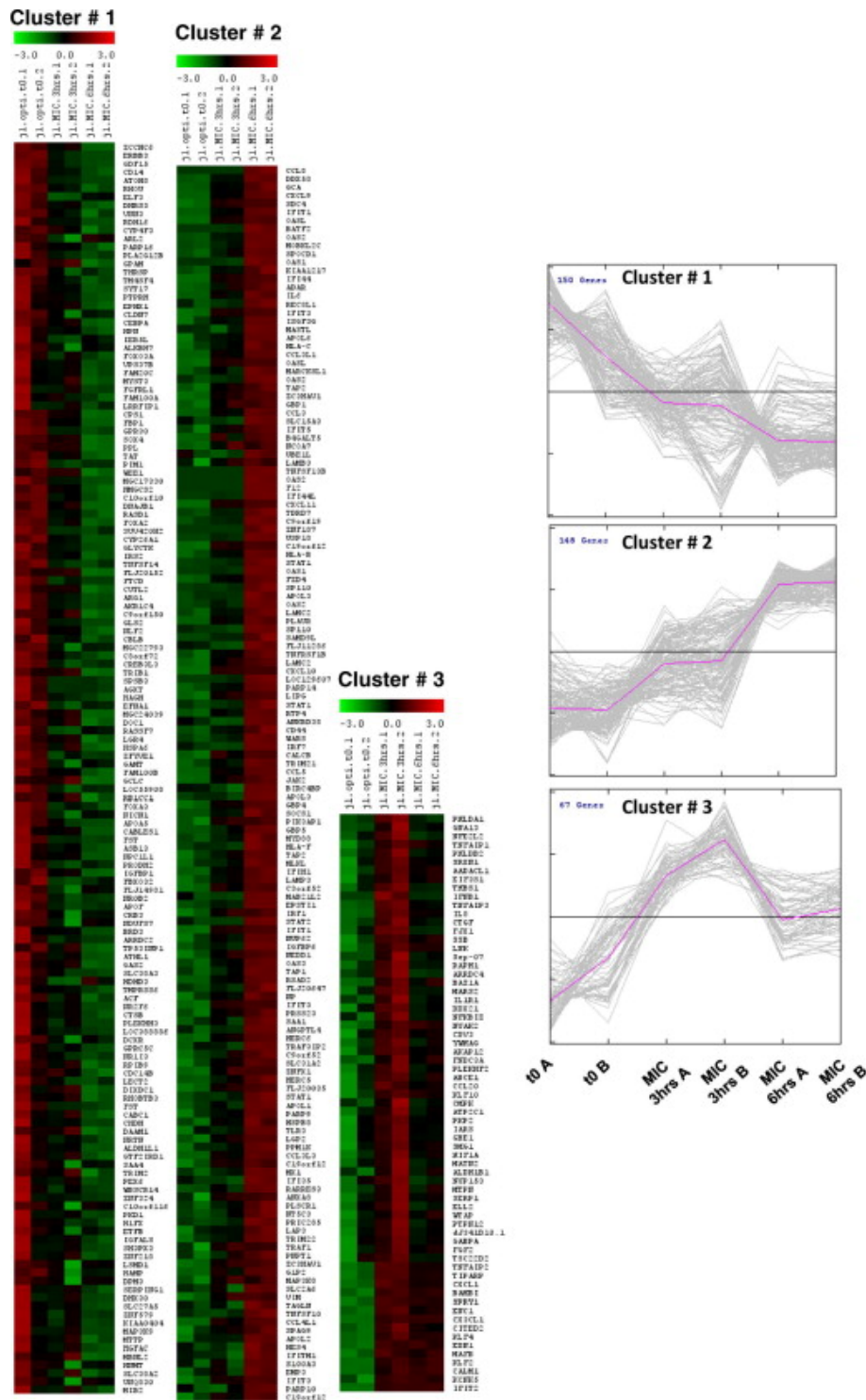
**Figure S1:** Characterization of freshly isolated hepatocyte preparations



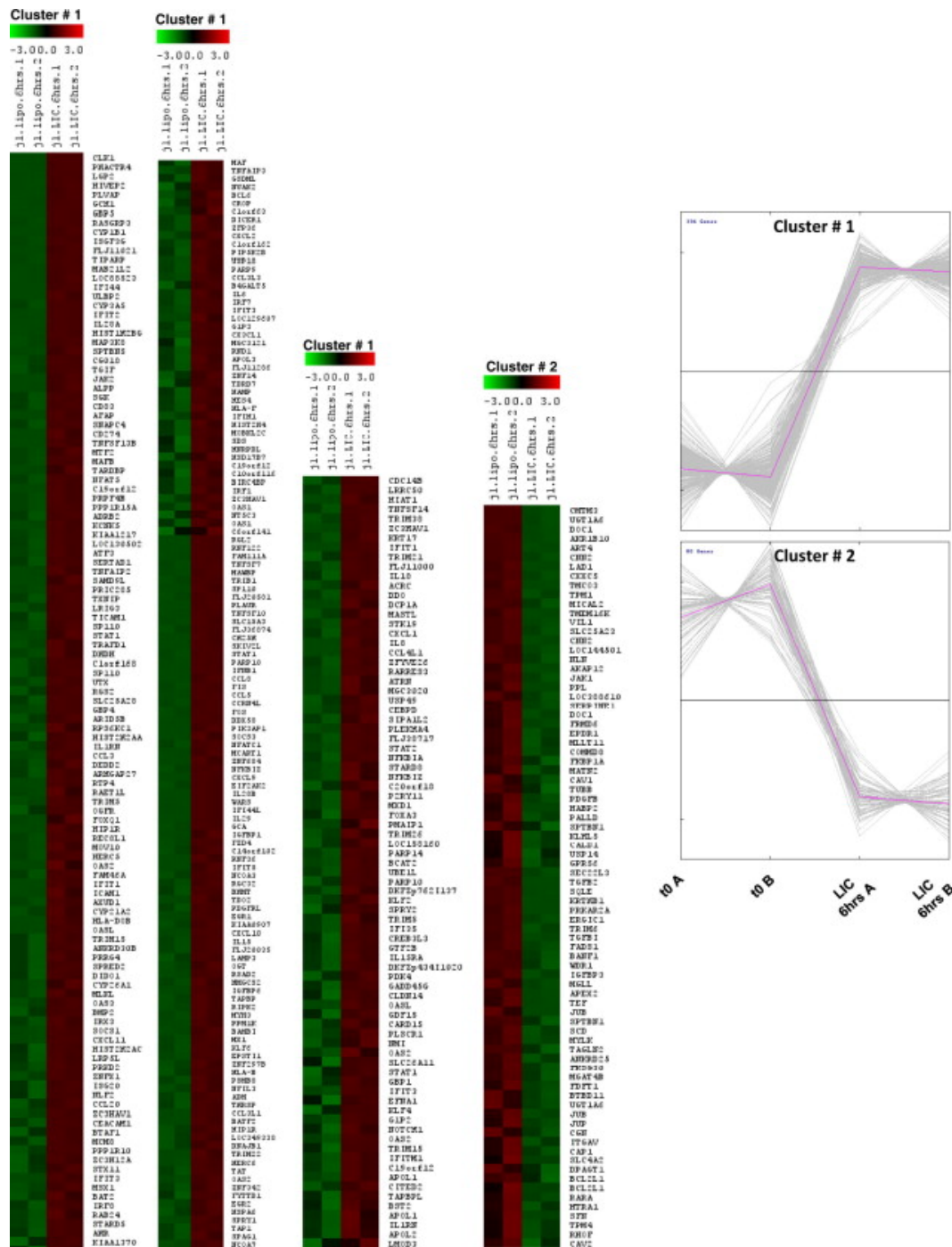
**Figure S2:** Expression of innate immune sensors TLR3, MDA5 and RIGI in normal primary human hepatocytes



**Figure S3:** Overall changes in gene expression in primary human hepatocytes after extracellular dsRNA treatment can be grouped in 3 different clusters



**Figure S4:** Overall changes in gene expression in human primary hepatocytes after intracellular dsRNA treatment can be grouped in 2 different clusters



## **CHAPITRE 3**

**Effet de la protéase NS3/4A du VHC à l'échelle du transcriptome sur les voies de signalisation antivirales dans des hépatocytes primaires humains**



## 1. Introduction

Dans l'article 1, nous avons clairement établi que la réponse antivirale induite suite à l'activation de la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire était interférée de façon significative par la protéase virale NS3/4A et rétablie en présence de l'inhibiteur spécifique BILN2061 qui cible l'activité protéolytique de cette protéase. En parallèle, nous étions également intéressés à éclaircir les activités d'interférence ciblant la voie TLR3-TRIF, voie-clé stimulée par l'ARNdb extracellulaire. En effet, la subversion de la voie TLR3 est encore sujette à débat. Si le clivage de TRIF a été clairement démontré *in vitro*, aucune observation *in vivo* n'établit un lien clair entre la présence de NS3/4A, le clivage de TRIF et une diminution de l'induction par cette voie de signalisation de l'expression des gènes de la réponse antivirale. Dans cet article, nous avons clairement établi que l'expression de la protéase virale dans des hépatocytes humains n'induisait ni le clivage, ni la diminution de l'adaptateur TRIF. De plus, suite à la quantification par qPCR en temps réel de trois de nos gènes antiviraux-clé, nous avons observé une diminution de l'expression de ces gènes, sans toutefois qu'il y ait eu rétablissement par BILN2061. Nous avons donc conclu que contrairement à la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire, si les gènes antiviraux induits par la voie TLR3-TRIF ne sont que très peu affectés par NS3/4A, c'est que la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire n'est probablement pas la principale voie mise en jeu dans le cadre de la reconnaissance du VHC par l'hépatocyte.

Ceci dit, si la protéine NS3/4A exerce un faible effet de subversion sur l'expression des gènes antiviraux-clé lors d'une stimulation avec de l'ARNdb extracellulaire, il n'est pas exclu que d'autres cascades de signalisation soient différenciellement régulées en présence de NS3/4A dans ce contexte d'activation. Dans ce présent chapitre, nous présentons nos données obtenues par microarrays portant sur l'effet de la protéine NS3/4A à l'échelle du transcriptome sur les voies de détection de l'ARNdb intracellulaire (RIG-I/MDA5-CARDIF) et extracellulaire (TLR3-TRIF) dans des hépatocytes primaires humains. Nous présenterons les différents logiciels que nous avons utilisés afin d'avoir une meilleure compréhension, à l'échelle du transcriptome, des modifications d'expression génique engendrées par l'expression de NS3/4A dans le cadre de l'activation de ces voies, ainsi que l'effet de l'inhibiteur BILN2061. Nous détaillerons donc les résultats de nos analyses ainsi que les nouvelles avenues de recherche qu'il serait intéressant d'explorer.

## 2. Méthodologie

### 2.1 Traitement des échantillons et outils d'analyse bioinformatique

Comme nous l'avons précisé dans la section Matériel et Méthodes de l'article 1, un système d'expression lentiviral a été choisi pour exprimer NS3/4A dans nos hépatocytes primaires normaux en culture. Nous avons par la suite procédé aux deux types de stimulation avec de l'ARNdb (poly(I :C)) de façon intra et extracellulaire. Étant donné les résultats obtenus avec nos expériences de cinétique sur la stimulation des voies antivirales dans des hépatocytes primaires humains normaux, nous avons choisi les temps 3 et 6 hrs pour la durée d'activation de la voie extracellulaire, et uniquement 6 hrs pour la voie intracellulaire. Les différentes stimulations ont eu lieu en présence ou non de l'inhibiteur de protéase BILN2061 de façon à contrôler la spécificité de nos observations.

Suite à l'extraction des ARNs cellulaires totaux, leur qualité a été vérifiée par électrophorèse capillaire et leur quantité par densité optique à 260 nm. Suite à ces contrôles, les expériences d'hybridation ont pu être effectuées. Cette partie de méthodologie a été mise en place par Nadia Kettaf de la plateforme de génomique au CHUM (Centre Hospitalier de l'Université de Montréal). Les données brutes obtenues suite à la quantification des intensités de fluorescence ont été normalisées et filtrées de façon à éliminer le bruit de fond et à générer des listes de gènes prêtes à être analysées selon nos critères et nos points d'intérêt. Le traitement des données brutes ainsi que les analyses initiales ont été effectuées par Geneviève Boucher du service de bioinformatique de l'IRIC (Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie). Le détail de la méthodologie utilisée pour la normalisation et le filtrage des données apparaît dans la section Matériel et Méthodes supplémentaires de l'article 1. Brièvement, l'étape de normalisation correspond à l'application d'un facteur de correction afin de corriger le biais entre les deux marqueurs de fluorescence utilisés. L'objectif de cette normalisation est d'identifier des sources parasites de variations des expressions. On cible par exemple l'hétérogénéité du bruit de fond ou encore l'hétérogénéité du signal. La normalisation des données est une étape cruciale dans la création du tableau de données sur lequel reposera l'analyse statistique. Pour décider qu'un gène est différentiellement exprimé entre deux conditions, on teste si les moyennes obtenues pour les différents réplicats sont égales au moyen du test de Student (t-test). Dans notre cas, le logiciel Bioconductor a été utilisé afin d'éliminer les gènes à trop faible expression ou bien ceux dont la variation d'expression entre les différents échantillons était insuffisante. Suite à ces étapes initiales de traitement des données, 4996 gènes ont été conservés.

L'analyse des données de Microarrays est complexe et vaste, c'est pourquoi un moyen optimal de visualiser ce type de résultats repose sur la représentation des données d'expression génique obtenues sous forme de graphiques. Nous avons utilisé plus particulièrement deux outils d'analyse :

- MeV (MultiexperimentViewer) au: <http://www.tm4.org/>
- DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) au: <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>

Le Multiexperiment Viewer est une des applications permettant l'analyse de données générées par microarrays originellement développée par The Institute for Genomic Research (TIGR). Une fois que les données chiffrées sont entrées dans le logiciel, ce dernier convertit la valeur d'expression numérique en une couleur qui est extraite d'une palette de gradient de couleurs. Initialement, la valeur la plus faible est associée à la valeur -3 et la plus forte à +3. Les modules d'analyse disponibles dans MeV permettent de sous-diviser les gènes dans des groupes soit de façon arbitraire (Clustering hiérarchique), soit basé sur des méthodes statistiques (k-means), des algorithmes ou des caractéristiques biologiques communes (TEASE).

Cet outil d'analyse statistique permet entre autre le regroupement de gènes dont les profils d'expression sont identiques (« clustering »). Ainsi, le clustering permet éventuellement de révéler une fonction potentielle de gènes encore non caractérisée basé sur l'hypothèse que des gènes co-exprimés peuvent être reliés fonctionnellement. Deux types de clustering peuvent être utilisés, soit le clustering supervisé ou non supervisé. Le clustering hiérarchique est une analyse non supervisée, qui détermine les distances entre les gènes selon la méthode euclidienne et qui établit une liaison des gènes les plus proches (arbre hiérarchique). Nous avons également utilisé le «K means », qui est une analyse de clustering supervisée permettant le classement des gènes dans un nombre fixe de classes (k) en fonction de leur profil d'expression, la distance moyenne entre les gènes dans un cluster donné étant la plus petite possible. Les gènes sont déplacés de clusters en clusters jusqu'à ce que tout changement n'améliore plus le système. Le logiciel minimise la variabilité au sein des clusters et maximise la variabilité entre les clusters. Toujours dans MeV, nous avons également utilisé l'outil d'analyse TEASE pour Tree-EASE qui permet d'associer des fonctions biologiques à un groupe de gènes, et qui permet donc à partir d'une liste de gènes, de définir les familles fonctionnelles principales caractérisant un cluster.

L'outil DAVID (Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery) est un outil en ligne d'annotation fonctionnelle, de classification et d'interaction à partir d'une liste de gènes donnée. DAVID permet également d'associer à un groupe de gènes, des fonctions biologiques, des localisations cellulaires, des voies de signalisation commune ou encore une pathologie définie associée à un profil donné. L'association d'un gène à une fonction ou à un groupe fonctionnel est déterminée selon une valeur p. Cette valeur p, qui varie de 0 à 1 est utilisée pour les analyses d'enrichissement de gènes. Elle est calculée selon un test de Fisher modifié. Au plus cette valeur est faible, au plus elle est significative : habituellement, une valeur p égale ou inférieure à 0.05 est significative. Dans le système d'annotation DAVID, cette valeur est déterminée en rapport à la proportion de gènes associés à une catégorie fonctionnelle sur le total de gènes soumis. Par exemple, sur l'ensemble des gènes du génome humain (30000 gènes), un nombre x fixe de gènes appartient à la catégorie « apoptose ». Le test compare le rapport  $x/30000$  et le rapport  $a/b$ , dans lequel b représente l'ensemble des gènes de la liste que l'on a soumis, et a, l'ensemble des gènes de notre liste appartenant à la catégorie d'intérêt, par exemple, l'apoptose. C'est la comparaison  $x/30000$  et  $a/b$  qui est évaluée et qui détermine la valeur p.

## 2.2 Définition et sélection des clusters d'intérêt

### 2.2.1 poly(I :C) intracellulaire

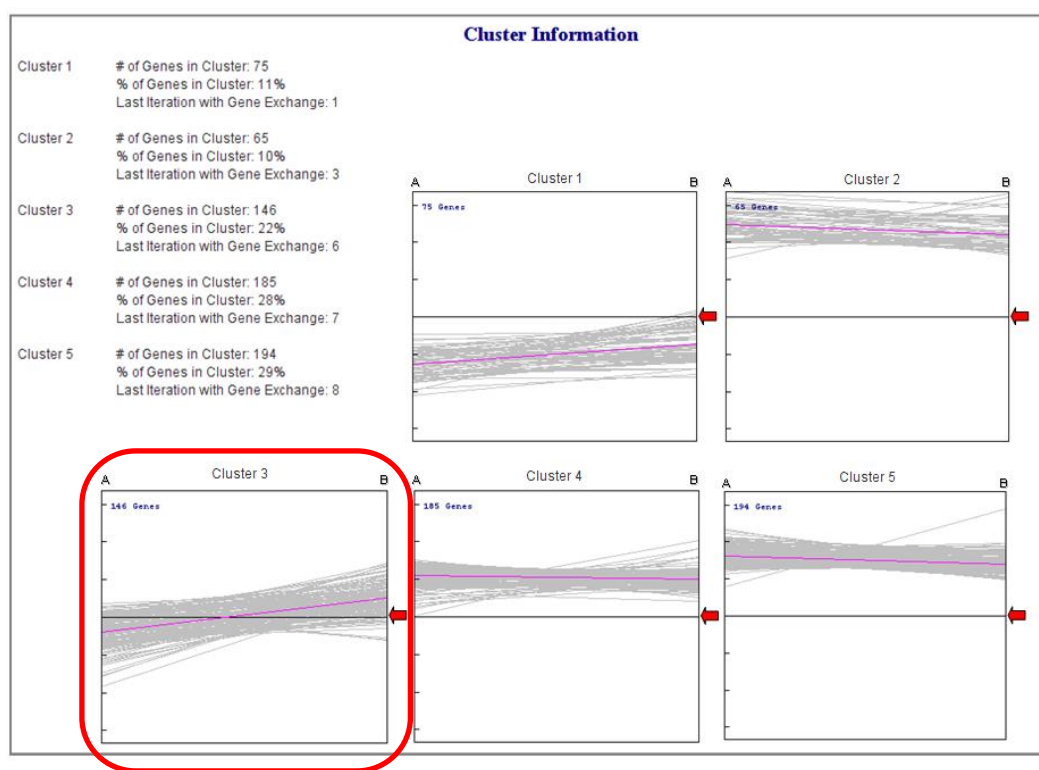
Pour l'analyse transcriptomique d'hépatocytes primaires exprimant la NS3/4A de façon ectopique et stimulés avec de l'ARNdb intracellulaire, nous avons sélectionné les gènes pour lesquels les niveaux d'induction dans au moins une des trois conditions (lentivirus vide, NS3/4A, NS3/4A+BILN2061) étaient  $\geq 2$  ou  $\leq -2$ . Nous avons établi deux listes de gènes représentant l'induction des gènes en présence de la protéase virale avec ou sans l'inhibiteur BILN2061, par rapport au contrôle lentiviral vide dans les mêmes conditions de stimulation. Nous avons obtenu 665 gènes répondant à ces critères sur la liste initiale de 4996 gènes obtenus après filtrage primaire des données. Afin de construire notre analyse, nous avons exprimé les valeurs d'induction de chaque gène en LOG2 pour le lentivirus vide et celui exprimant NS3/4A respectivement, avec ou sans BILN2061, soit:

Colonne A=  $\text{LOG2}(\text{niveau d'induction})_{\text{vecteur NS3/4A}} - \text{LOG2}(\text{niveau d'induction})_{\text{vecteur vide}}$

Colonne B=  $\text{LOG2}(\text{niveau d'induction})_{\text{vecteur NS3/4A+BILN}} - \text{LOG2}(\text{niveau d'induction})_{\text{vecteur vide}}$

Niveau d'induction= niveau après stimulation/niveau de base

Les listes de gènes correspondant aux colonnes A et B furent soumises à l’outil d’analyse k-means du logiciel MeV. Nous avons choisi  $k=5$ , afin que le logiciel crée cinq groupes de gènes avec des profils d’expression spécifiques à chacun des groupes (**Fig. 1**). Parmi les cinq groupes obtenus, nous nous sommes concentrés sur le cluster 3 (voir section Résultats). En effet, les clusters 2, 4 et 5 regroupent des gènes induits par la protéase virale et non rétablis par BILN2061, donc affectés de façon indépendante à l’activité protéolytique de la protéase. S’il pourrait être intéressant d’étudier plus en détail ces groupes de gènes, cela sort néanmoins de notre objectif ici. Le cluster 1 quant à lui regroupe des gènes dont l’induction est diminuée par l’expression de NS3/4A, mais peu ou pas rétablie par BILN2061.



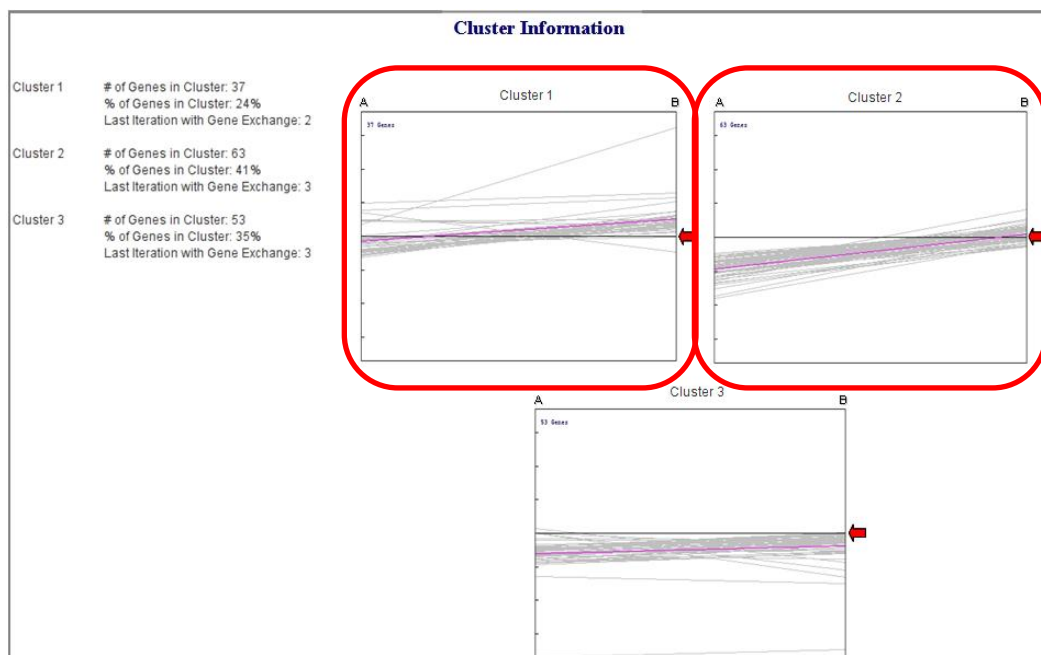
**Figure 1 :** Résultat de la méthode analytique de « clustering » k-means sur l’ensemble du transcriptome d’hépatocytes primaires humains exprimant la protéase virale NS3/4A avec ou sans inhibiteur et stimulés avec de l’ARNdb (poly(I :C)) intracellulaire

Regroupement des 665 gènes induits différemment par la protéase NS3/4A après stimulation de la voie de détection de l’ARNdb intracellulaire en cinq groupes selon leurs profils d’expression construits à partir de la méthode analytique de « clustering » k-means. Cette technique permet de grouper les gènes avec des profils d’expression similaires. Le profil d’expression moyen pour chaque groupe est calculé et indiqué en rouge. L’unité de l’axe des y est indiquée en score z indiquant l’expression relative. Le nombre de gènes de chaque cluster (groupe) est indiqué dans chaque ensemble. L’axe vertical portant la lettre A indique les niveaux d’expression des gènes en présence de NS3/4A, alors que l’axe B indique les niveaux d’expression de ces mêmes gènes en présence de NS3/4A et BILN2061, l’inhibiteur spécifique. Chacune des lignes grises représente un gène du cluster, et la ligne en rose centrale représente l’expression moyenne de tous les gènes du cluster. L’axe horizontal indiqué par la flèche rouge représente le niveau moyen d’expression obtenu pour le contrôle, c’est-à-dire le vecteur vide après stimulation de la voie. Dans le cas de la stimulation de la voie intracellulaire, nous nous sommes intéressés au cluster 3, le seul regroupant des gènes dont l’expression est affectée négativement par la protéase virale par rapport au contrôle, suivi d’un rétablissement en présence de BILN2061.

### 2.2.2 ARNdb transcrit *in vitro* intracellulaire

Nous avons également vérifié l'interférence par la protéase NS3/4A de la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire en transfectant cette fois-ci l'ARN du génome du VHC transcrit *in vitro*, qui est détecté par RIG-I au lieu de MDA5, ce dernier ayant plutôt été décrit pour son rôle dans la reconnaissance du poly(I :C). Nous avons donc choisi l'ARN du réplicon AB12 de génotype 1A, que nous avons transcrit *in vitro* puis transfecté dans nos cellules. L'ARN correspond donc au génome du VHC, avec cependant certaines modifications (voir Fig. 22, chapitre 1). De façon intéressante, nous avons trouvé que seuls 157 gènes variaient de façon significative en présence de NS3/4A, contrairement aux 665 gènes obtenus après transfection du poly(I :C). Il est difficile de comparer ces deux types d'ARN dans la mesure où le poly(I :C) n'a pas une longueur définie comme c'est le cas pour l'ARN transcrit *in vitro*; il est donc possible que la quantité de poly(I :C) transfectée soit largement supérieure en terme de nombre de molécules et (non en terme de  $\mu\text{g}$ ) à celle de l'ARNdb transcrit *in vitro* transfecté.

Lorsque nous avons soumis nos données à l'outil Mev afin d'obtenir les différents profils d'expression génique, 153 gènes sur 157 ont été regroupés en trois différents clusters (**Fig. 2**). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux clusters 1 et 2 qui présentent des gènes plus clairement affectés par NS3/4A et réparés en présence de BILN2061 que les gènes regroupés dans le cluster 3 (voir section Résultats).



**Figure 2 :** Résultat de la méthode analytique de « clustering » k-means sur l'ensemble du transcriptome d'hépatocytes primaires humains exprimant la protéase virale NS3/4A avec ou sans inhibiteur et stimulés avec de l'ARNdb (transcrit *in vitro*) intracellulaire

Regroupement des 153 gènes induits différemment par la protéase NS3/4A après stimulation de la voie de détection de l'ARNdb (transcrit *in vitro*) intracellulaire en trois groupes selon leurs profils d'expression construit à partir de la méthode analytique de « clustering » k-means. Cette technique permet de grouper les gènes avec des profils d'expression similaires. Le profil d'expression moyen pour chaque groupe est calculé et indiqué en rouge. L'unité de l'axe des y est indiquée en score z indiquant l'expression relative. Le nombre de gènes de chaque cluster (groupe) est indiqué dans chaque ensemble. L'axe vertical portant la lettre A indique les niveaux d'expression des gènes en présence de NS3/4A, alors que l'axe B indique les niveaux d'expression de ces mêmes gènes en présence de NS3/4A et BILN2061, l'inhibiteur spécifique. Chacune des lignes grises représente un gène du cluster, et la ligne en rose centrale représente l'expression moyenne de tous les gènes du cluster. L'axe horizontal indiqué par la flèche rouge représente le niveau moyen d'expression obtenu pour le contrôle, c'est-à-dire le vecteur vide après stimulation de la voie. Dans le cas de la stimulation de la voie intracellulaire, nous nous sommes intéressés aux clusters 1 et 2, regroupant des gènes dont l'expression est affectée négativement par la protéase virale par rapport au contrôle, suivi d'un rétablissement en présence de BILN2061.

### 2.2.3 poly(I :C) extracellulaire

Afin de mettre en évidence l'effet de la NS3/4A sur la voie de détection médiée par le TLR3, nous avons établi quatre listes de gènes représentant l'induction des gènes en présence de la protéase virale avec ou sans BILN2061, par rapport au contrôle lentiviral vide dans les mêmes conditions de stimulation. Nous avons sélectionné les gènes pour lesquels les niveaux d'induction dans au moins une des trois conditions (lentivirus vide, NS3/4A, NS3/4A+BILN2061) étaient  $\geq 2$  ou  $\leq -2$  aux temps 3 hrs ou 6 hrs. Nous avons obtenu 854 gènes répondant à ces critères sur la liste initiale de 4996 gènes obtenus après filtrage primaire de nos données. Afin de construire notre analyse, nous avons exprimé les valeurs d'induction de chaque gène en LOG2 pour chacune des conditions, soit :

Colonne A=  $\text{LOG2}(\text{niveau d'induction})_{\text{vecteur NS3/4A 3hrs}} - \text{LOG2}(\text{niveau d'induction})_{\text{vecteur vide 3hrs}}$

Colonne B=  $\text{LOG2}(\text{niveau d'induction})_{\text{vecteur NS3/4A+BILN 3hrs}} - \text{LOG2}(\text{niveau d'induction})_{\text{vecteur vide 3hrs}}$

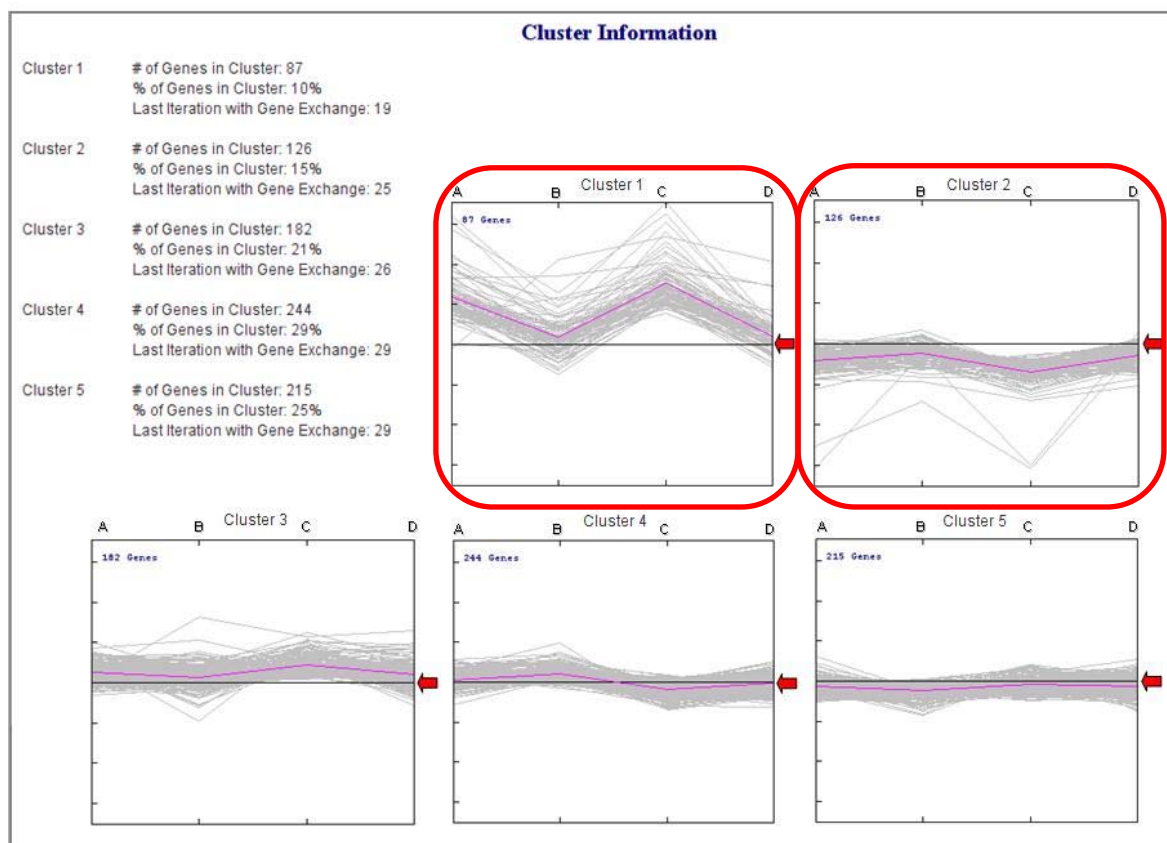
Colonne C=  $\text{LOG2}(\text{niveau d'induction})_{\text{vecteur NS3/4A 6hrs}} - \text{LOG2}(\text{niveau d'induction})_{\text{vecteur vide 6hrs}}$

Colonne D=  $\text{LOG2}(\text{niveau d'induction})_{\text{vecteur NS3/4A+BILN 6hrs}} - \text{LOG2}(\text{niveau d'induction})_{\text{vecteur vide 6hrs}}$

Niveau d'induction= niveau après stimulation/niveau de base

Ces listes furent par la suite soumises à l'outil d'analyse k-means de MeV, afin de faire ressortir les différents profils d'expression retrouvés (**Fig.3**). Comme nous pouvons le voir, le cluster 2 regroupe des gènes dont le profil d'expression indique un effet d'interférence par la protéase NS3/4A suivi d'un rétablissement par BILN2061. On retrouve la même tendance avec le cluster 5, mais ce dernier regroupe des gènes dont les profils de variation sont beaucoup moins accentués que le cluster 2. Nous avons donc concentré nos analyses sur le cluster 2 (voir section Résultats). Nous nous sommes également intéressés au cluster 1, qui, quant à lui, regroupe des gènes fortement induits en présence de NS3/4A et rétablis lorsque l'inhibiteur spécifique BILN2061 est présent (voir section Résultats).





**Figure 3 :** Résultat de la méthode analytique de « clustering » k-means sur l'ensemble du transcriptome d'hépatocytes primaires humains exprimant la protéase virale NS3/4A avec ou sans inhibiteur et stimulés avec de l'ARNdb extracellulaire

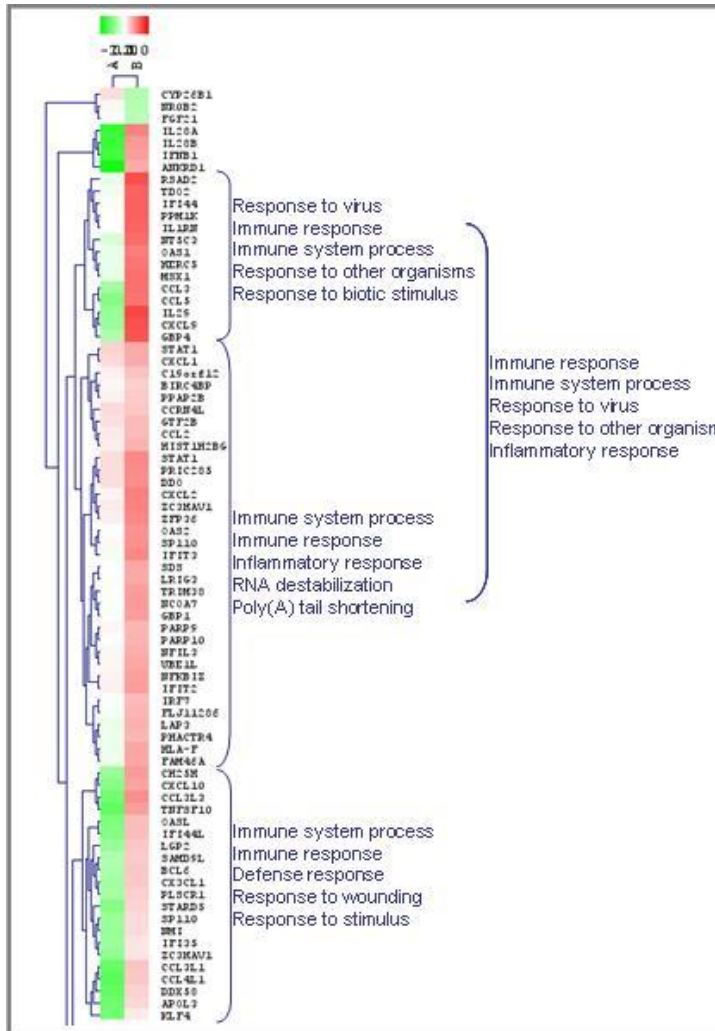
Regroupement des 854 gènes induits après stimulation de la voie extracellulaire en cinq groupes selon leurs profils d'expression contruit à partir de la méthode analytique de « clustering » k-means. Cette technique permet de grouper les gènes avec des profils d'expression similaires. Le profil d'expression moyen pour chaque groupe est calculé et indiqué en rouge. L'unité de l'axe des y est indiquée en score z indiquant l'expression relative. Le nombre de gènes de chaque cluster (groupe) est indiqué dans chaque ensemble. L'axe vertical portant la lettre A indique les niveaux d'expression des gènes en présence de NS3/4A après 3hrs de stimulation, la lettre B après 3hrs de stimulation en présence de BILN2061 alors que les axes C et D après 6hrs de stimulation en absence ou en présence de BILN2061. Chacune des lignes grises représente un gène du cluster, et la ligne en rose centrale représente l'expression moyenne de tous les gènes du cluster. L'axe horizontal indiqué par la flèche rouge représente le niveau moyen d'expression obtenu pour le contrôle, c'est-à-dire le vecteur vide après stimulation de la voie en absence de NS3/4A. Nous avons sélectionné les clusters 1 et 2 pour investiguer les rôles de NS3/4A dans cette voie de signalisation.

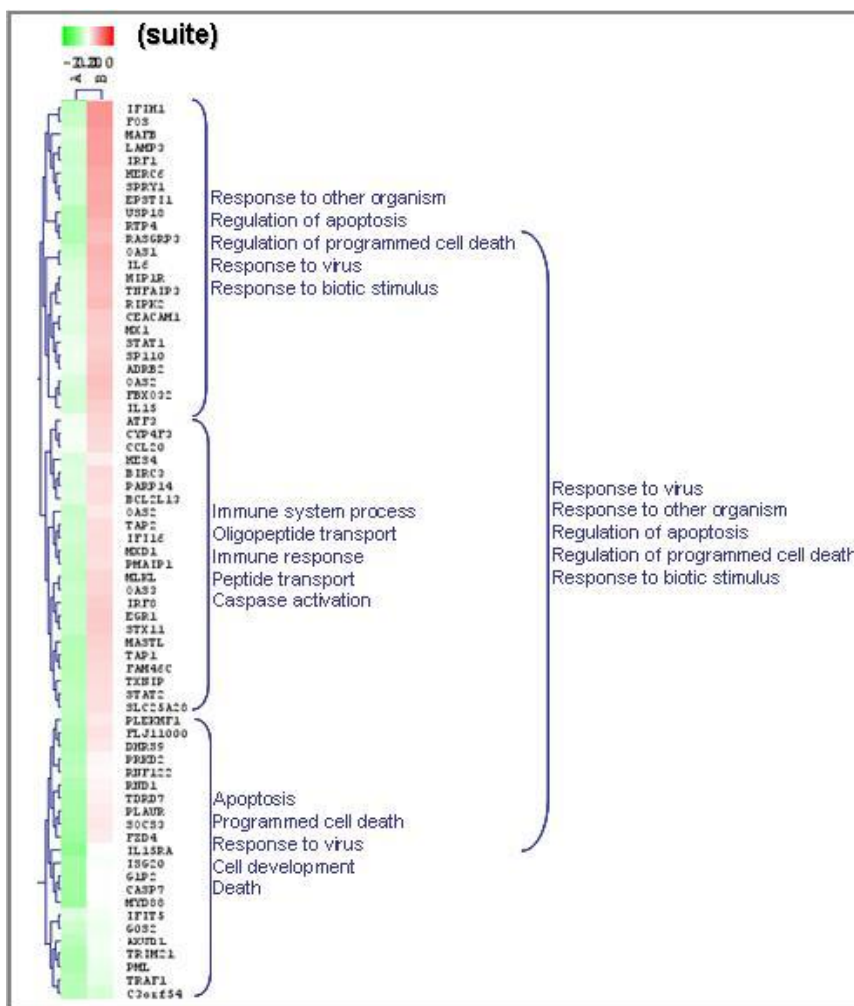
## 3. Résultats

### 3.1 Interférence majeure de la réponse immunitaire innée induite par l'ARNdb intracellulaire en présence de la protéase NS3/4A du VHC

#### 3.1.1 Poly(I :C) intracellulaire

Nous nous sommes intéressés au cluster 3 (**Fig. 1**), regroupant des gènes affectés par la protéase, et rétablis en présence de BILN2061. Ce cluster regroupe 146 gènes, soit 22% de l'ensemble des gènes appartenant à la liste soumise initialement. Un outil particulièrement intéressant d'utiliser à ce stade-ci, est le TEASE, permettant de dresser un « clustering hiérarchique » dans lequel sont classés les gènes en fonction de leur variation d'expression et de leur appartenance à une fonction biologique donnée. Comme nous le présentons à la **Fig. 4**, cet outil nous permet de conclure que les gènes les plus significativement affectés par l'activité protéolytique de la protéase NS3/4A suite à une stimulation avec de l'ARNdb intracellulaire sont des gènes de la réponse immunitaire antivirale ou associés à la défense de l'hôte. On relève également un groupe de gènes dont l'expression est diminuée par NS3/4A et dont la fonction biologique est associée à l'apoptose ou à la mort cellulaire. Nous y reviendrons plus tard.





**Figure 4:** Variation d'expression génique après stimulation d'hépatocytes primaires humains normaux avec de l'ARNdb intracellulaire en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061

Résultat de l'analyse transcriptionnelle et de la classification fonctionnelle des 146 gènes différemment induits après stimulation de la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061 sélectionnés à partir du cluster 3 de la Fig.1. Le graphique a été produit en soumettant la liste de gènes à l'outil permettant un clustering hiérarchique (HCL clustering). Les données concernant les fonctions biologiques ont été obtenues via l'outil TEASE. Les différences d'expression sont visualisées par des différentes nuances de couleur. Chaque case de couleur correspond à une intensité du ratio d'expression (voir échelle). Les ratios d'expression ont été calculés en soustrayant le bruit de fond obtenu par les inductions pour les différents gènes avec le lentivirus contrôle. La couleur rouge indique une abondance relative augmentée du transcrite comparée à la moyenne d'expression de ce même gène en présence du vecteur lentiviral contrôle, alors que la couleur verte indique une diminution d'abondance relative du transcrite; la couleur blanche représente des niveaux identiques à ceux obtenus avec le contrôle. Les gènes sont présentés individuellement le long de l'axe vertical, alors que les colonnes indiquent en A les niveaux d'expression en présence de NS3/4A, et en B en présence de NS3/4A + BILN2061.

Une autre façon d'analyser un groupe de gènes donné est d'utiliser l'outil DAVID disponible en ligne qui permet entre autre d'associer des GO\_TERMS, c'est-à-dire des termes et fonctions biologiques à un groupe de gènes donné. Ainsi, lorsque l'on soumet cette même liste de 146 gènes à l'outil DAVID, on s'aperçoit que 67 gènes sur 137 identifiés appartiennent au

GO\_TERM « response to stimulus » avec une valeur p de  $3.6^E-12$ , dont 36 appartiennent au GO\_TERM « immune response » avec une valeur p de  $4.0^E-18$ , et 21, soit 15.3%, appartiennent au GO\_TERM « response to virus » avec une valeur p de  $1.7^E-21$ . Tout comme ce que l'on avait obtenu avec l'outil MeV (voir **Fig. 4**), nous avons également relevé le GO\_TERM «regulation of apoptosis » pour 22 gènes, avec une valeur p de  $4.3^E-06$ . Finalement, un autre type d'analyse par le logiciel DAVID a permis d'associer à la liste de gènes correspondant au cluster 3 les voies de signalisation « cytokine-cytokine receptor interaction » avec 19 gènes et une valeur p de  $8.8^E-10$ , ainsi que « Toll-like receptor signaling pathway » avec 10 gènes et une valeur p de  $2.8^E-06$ , et finalement « Jak-STAT signaling pathway » pour 11 gènes avec une valeur p de  $1.4^E-05$ .

Dans le **Tableau 1**, nous avons dressé une courte liste des niveaux d'induction obtenus en présence du vecteur vide ainsi que du vecteur codant pour NS3/4A avec ou sans BILN2061, pour quelques gènes appartenant à différentes catégories fonctionnelles et qu'il serait intéressant de confirmer par PCR quantitatif. Il est d'ailleurs intéressant de constater que d'autres catégories fonctionnelles que celles associées à la réponse antivirale et immune peuvent être affectées par NS3/4A comme par exemple des gènes associés aux GO\_TERMS « regulation of apoptosis » ou « regulation of programmed cell death ». Parmi ces gènes, on relève par exemple le *TNFSF10* (codant pour TRAIL) dont l'expression est particulièrement affectée par NS3/4A de façon protéolytique-dépendante. Or ce gène code pour une cytokine appartenant à la famille des ligands du TNF et induit l'apoptose dans les cellules transformées ou tumorales. Suite à l'attachement de cette cytokine à son récepteur, elle active la kinase MAPK8/JNK, la caspase 8 ainsi que la caspase 3. Il serait particulièrement intéressant de vérifier si la NS3/4A interfère avec un phénomène apoptotique dans le cadre de l'activation de la voie de détection de l'ARN intracellulaire. L'interférence que l'on observe avec l'expression de la caspase 7 (*CASP7*) serait aussi à confirmer par PCR quantitatif. L'étude du transcriptome permet donc ici de mettre en lumière certaines voies de signalisation qu'il serait intéressant d'explorer plus en détail.

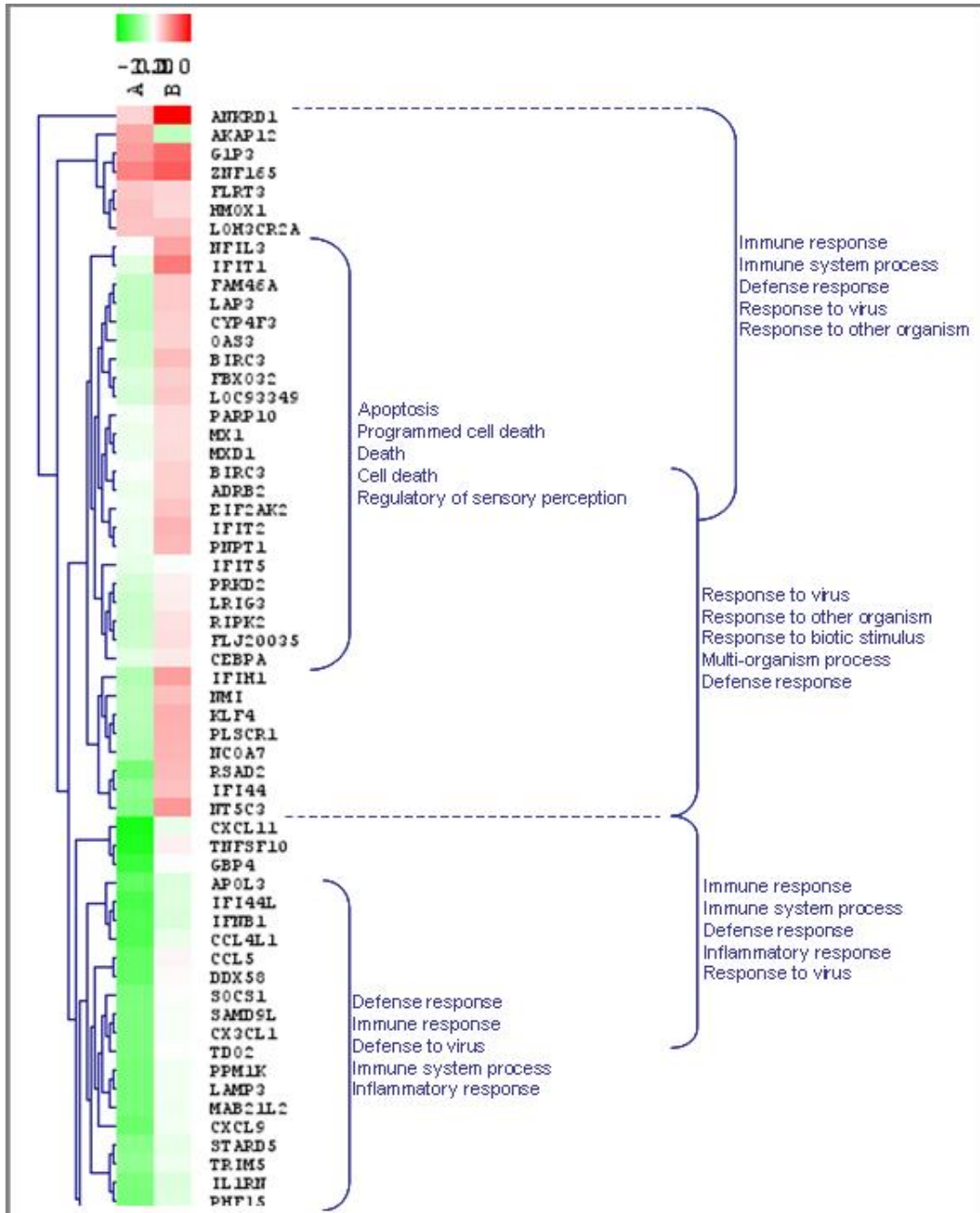
**Tableau 1** : Exemples de niveaux d'induction de gènes différentiellement régulés par NS3/4A et rétablis par BILN2061 après stimulation avec de l'ARNdb intracellulaire (poly(I :C))

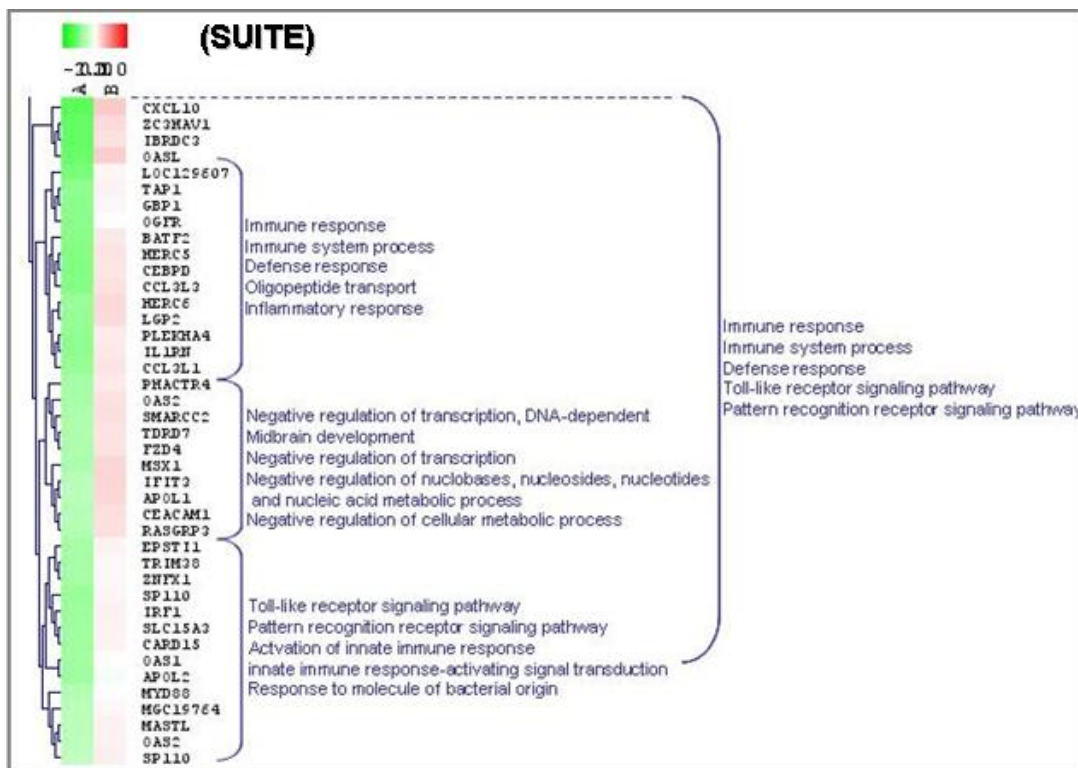
gene information		Fold change after 6hrs idsRNA stimulation			Functional information
Gene symbol	gene ID	ctr	NS3/4A	NS3/4A+B	GO_TERM
IL28A	282616	16.91	5.67	33.42	response to stimulus, response to virus
IL28B	282617	7.44	2.56	13.08	response to stimulus, response to virus
CCL5	6352	8.43	4.32	17.97	response to stimulus, response to virus
G1P2	9636	8.09	4.94	8.14	response to stimulus, response to virus
OASL	8638	26.88	13.46	38.51	response to stimulus, immune response
IFNB1	3456	41.70	14.92	71.33	response to stimulus, response to virus, regulation of apoptosis
TRAF1	7185	2.02	1.39	1.77	regulation of apoptosis, regulation of programmed cell death
CASP7	840	2.47	1.49	2.49	regulation of apoptosis, regulation of programmed cell death
PLEKHF1	79156	2.11	1.46	2.36	regulation of apoptosis, regulation of programmed cell death
RIPK2	8767	2.36	2.04	3.47	regulation of apoptosis, regulation of programmed cell death
TNFSF10	8743	14.02	5.99	24.00	regulation of apoptosis, regulation of programmed cell death
TNFAIP3	7128	3.69	3.13	5.23	regulation of apoptosis, regulation of programmed cell death
AXUD1	64651	2.47	1.73	2.33	apoptosis, programmed cell death
RIPK2	8767	2.36	2.04	3.47	apoptosis, programmed cell death

Les niveaux d'induction sont calculés dans chaque condition relativement aux valeurs obtenues avant la stimulation. Les valeurs obtenues pour le contrôle (ctr) représentent les niveaux d'induction obtenus en présence du vecteur lentiviral vide après stimulation, les deux autres conditions étant en présence du vecteur lentiviral codant pour la protéase NS3/4A avec ou sans BILN2061. Les GO\_TERMS associés à chacun de ces gènes ont été obtenus après soumission de la liste de gènes appartenant au cluster 3 (voir Fig.1) au programme en ligne DAVID. Des exemples de gènes appartenant à différentes catégories fonctionnelles sont présentés.

### 3.1.2 ARN transcrit *in vitro* intracellulaire

Comme nous le présentons à la **Fig. 5**, le TEASE utilisé sur notre liste de 100 gènes sélectionnés à partir des clusters 1 et 2 de la **Fig. 2** met clairement en évidence que les gènes les plus significativement affectés par l'activité protéolytique de la protéase NS3/4A suite à une stimulation avec de l'ARNdb intracellulaire transcrit *in vitro* sont des gènes de la réponse immunitaire antivirale ou associés à la défense de l'hôte. On relève également un petit groupe de gènes dont l'expression est diminuée par NS3/4A et dont la fonction biologique est associée à l'apoptose ou à la mort cellulaire. Nous y reviendrons plus tard.





**Figure 5:** Variation d'expression génique après stimulation d'hépatocytes primaires humains normaux avec de l'ARNdb intracellulaire (ARN transcrit *in vitro*) en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061

Résultat de l'analyse transcriptionnelle et de la classification fonctionnelle des 100 gènes différemment induits après stimulation de la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061 sélectionnés à partir des clusters 1 et 2 de la Fig.2. Le graphique a été produit en soumettant la liste de gènes à l'outil permettant un clustering hiérarchique (HCL clustering). Les données concernant les fonctions biologiques ont été obtenues via l'outil TEASE. Les différences d'expression sont visualisées par des différentes nuances de couleur. Chaque case de couleur correspond à une intensité du ratio d'expression (voir échelle). Les ratios d'expression ont été calculés en soustrayant le bruit de fond obtenu par les inductions pour les différents gènes avec le lentivirus contrôle. La couleur rouge indique une abondance relative augmentée du transcrit comparée à la moyenne d'expression de ce même gène en présence du vecteur lentiviral contrôle, alors que la couleur verte indique une diminution d'abondance relative du transcrit; la couleur blanche représente des niveaux identiques à ceux obtenus avec le contrôle. Les gènes sont présentés individuellement le long de l'axe vertical, alors que les colonnes indiquent en A les niveaux d'expression en présence de NS3/4A, et en B en présence de NS3/4A + BILN2061.

Sur les 100 gènes appartenant aux clusters 1 et 2, 95 d'entre eux ont été associés à des catégories fonctionnelles après soumission de ces données à DAVID. On retrouve la catégorie « response to stimulus » pour 44 gènes avec une valeur p de  $2.6^E-08$ ; on retrouve également « immune response » pour 27 gènes avec une valeur p de  $3.3^E-15$ , ainsi que « regulation of apoptosis » pour 12 gènes avec une valeur p de  $5.5^E-03$ . Le GO\_TERM « response to virus » est retrouvé pour 12 gènes, avec une valeur p de  $2.3^E-11$ . Les principales voies de signalisation identifiées sont « cytokine-cytokine receptor interaction » pour 9 gènes et une valeur p de  $7.4^E-05$ , ainsi que « Toll-like receptor pathway » pour 6 gènes et une valeur p de  $2.3^E-04$ . Nous avons donc dressé une liste plus détaillée (**Tableau 2**) avec les niveaux d'induction de quelques exemples de



gènes appartenant à différentes catégories fonctionnelles en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061. Tout comme ce que l'on avait observé avec le poly(I:C) transfecté, on retrouve également d'autres catégories fonctionnelles que celles associées à la réponse antivirale et immune qui sont affectées par NS3/4A comme par exemple des gènes associés aux GO\_TERMS « regulation of apoptosis » ou « regulation of programmed cell death ». Ainsi, il est intéressant de constater que l'expression du TNFSF10 est également affectée par la protéase NS3/4A. Par contre, d'autres gènes impliqués dans l'apoptose comme la caspase 8 ne sont pas affectés par la NS3/4A dans cette voie d'activation.

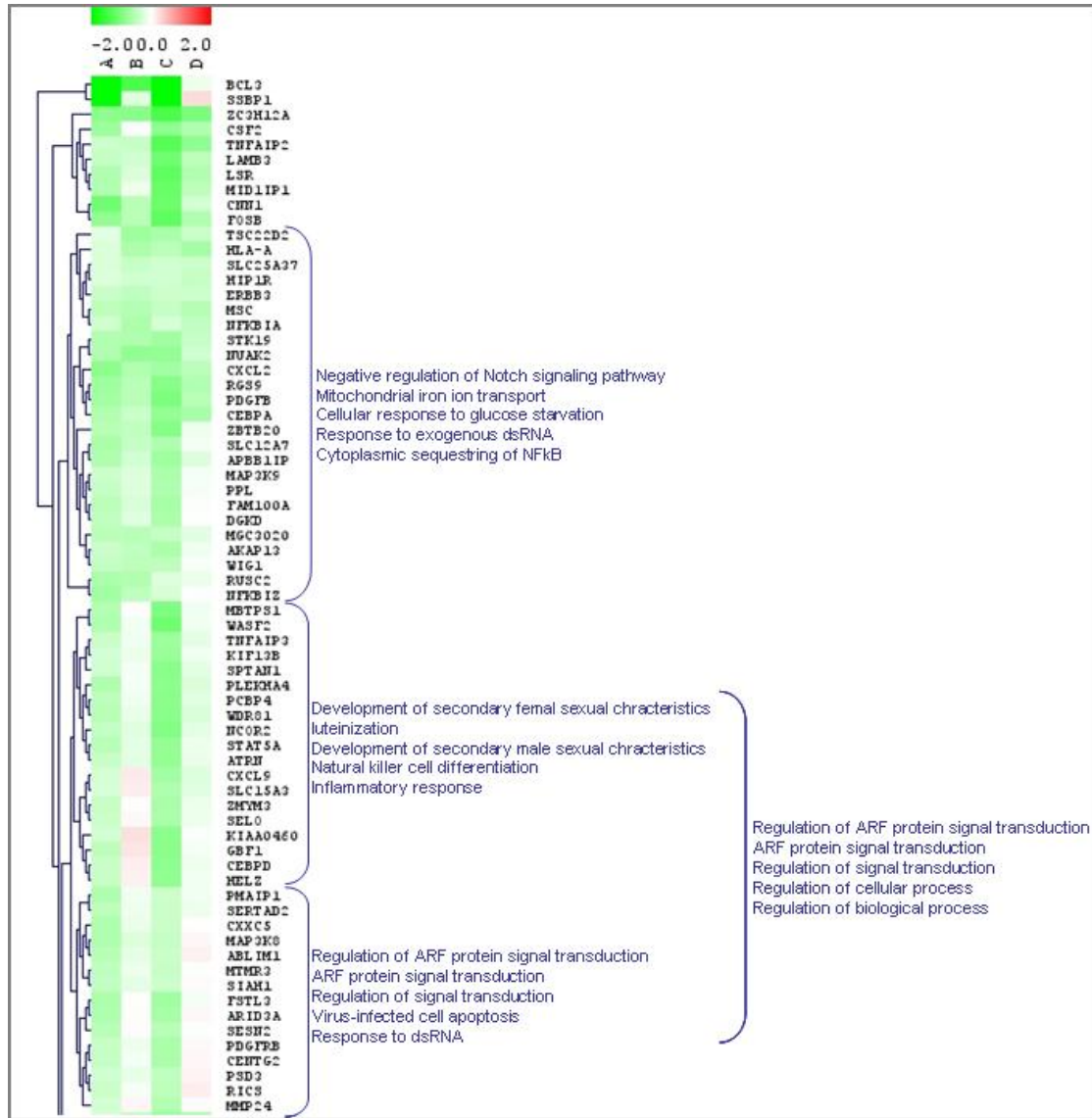
**Tableau 2:** Exemples de niveaux d'induction de gènes interférés par NS3/4A et rétablis par BILN2061 après stimulation avec de l'ARNdb intracellulaire (ARN transcrit *in vitro*)

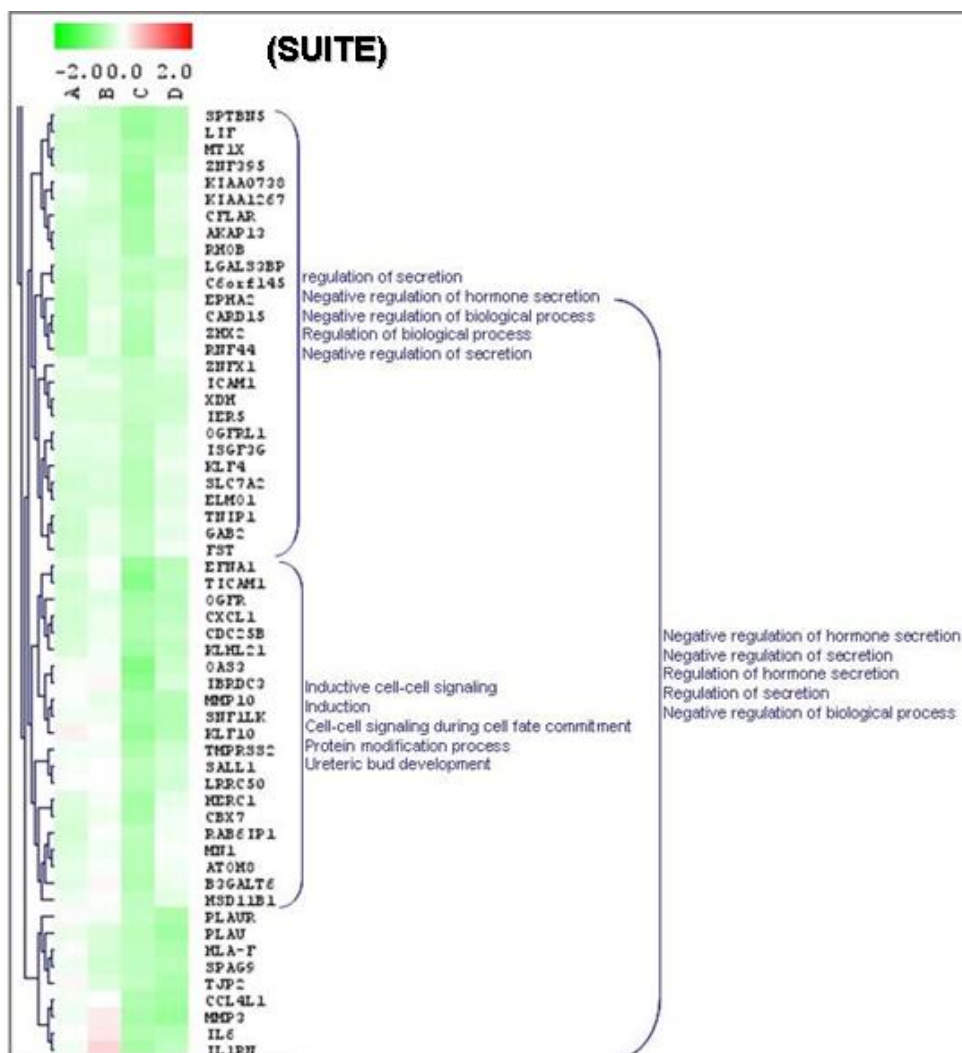
gene information		Fold change after 6hrs			Functional information
Gene symbol	gene ID	ctr	NS3/4A	NS3/4A+B	GO_TERM
CXCL10	3627	105.65	43.18	141.89	immune response, defense response
CXCL11	6373	33.37	9.48	29.77	immune response, defense response
RSAD2	91543	29.60	14.01	43.31	immune response, defense response
OASL	8638	26.80	12.06	35.02	response to stimulus, immune response
CCL5	6352	4.22	1.83	4.45	response to stimulus, response to virus
G1P2	9636	8.17	5.03	7.02	response to stimulus, response to virus
IFNB1	3456	4.55	1.79	3.73	response to stimulus, response to virus, regulation of apoptosis
TNFSF10	8743	19.65	5.90	21.28	regulation of apoptosis, regulation of programmed cell death
RIPK2	8767	2.42	1.81	2.85	regulation of apoptosis, regulation of programmed cell death

Les niveaux d'induction sont calculés dans chaque condition relativement aux valeurs obtenues avant la stimulation. Les valeurs obtenues pour le contrôle (ctr) représentent les niveaux d'induction obtenus en présence du vecteur lentiviral vide, les deux autres conditions étant en présence du vecteur lentiviral codant pour la protéase NS3/4A avec ou sans BILN2061. Les GO\_TERMS associés à chacun de ces gènes ont été obtenus après soumission de la liste de gènes appartenant aux clusters 1 et 2 (voir Fig.2) au programme en ligne DAVID. Des exemples de gènes appartenant à différentes catégories fonctionnelles sont présentés.

### 3.2 Interférence mineure de la réponse immunitaire innée induite par l'ARNdb extracellulaire en présence de la protéase NS3/4A du VHC

Nous nous sommes intéressés à la liste de gènes appartenant au cluster 2 (**Fig. 3**), que nous avons soumise au logiciel TEASE (**Fig. 6**). Ce cluster regroupe 126 gènes sur 854, soit 15% du total. Les gènes les plus interférés par la protéase virale et rétablis en présence de BILN2061, sont principalement impliqués dans la régulation de la sécrétion, dans la réponse à l'ARNdb, la réponse inflammatoire ou encore la régulation de la transduction de signal.





**Figure 6 :** Variation d'expression génique après stimulation d'hépatocytes primaires humains normaux avec de l'ARNdb extracellulaire en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061

Résultats de l'analyse transcriptionnelle et classification fonctionnelle des 126 gènes différemment induits après stimulation de la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061 sélectionnés à partir du cluster 2 de la Fig. 3. Le graphique a été produit en soumettant la liste de gènes à l'outil permettant un clustering hiérarchique (HCL clustering). Les données concernant les fonctions biologiques ont été obtenues via l'outil TEASE. Les différences d'expression sont visualisées par des nuances de couleur. Chaque case de couleur correspond à une intensité du ratio d'expression (voir échelle). Les ratios d'expression ont été calculés en soustrayant le bruit de fond obtenu par les inductions pour les différents gènes avec le lentivirus contrôle. La couleur rouge indique une abondance relative augmentée du transcrite comparée à la moyenne d'expression de ce même gène en présence du vecteur lentiviral contrôle, alors que la couleur verte indique une diminution d'abondance relative du transcrite; la couleur blanche représente les niveaux obtenus pour le contrôle. Les gènes sont présentés individuellement le long de l'axe vertical, alors que les colonnes indiquent en A les niveaux d'expression en présence de NS3/4A après 3 hrs de stimulation, en B en présence de NS3/4A + BILN2061 après 3 hrs de stimulation, en C en présence de NS3/4A après 6 hrs de stimulation, et en D après 6 hrs de stimulation en présence de NS3/4A+BILN2061.

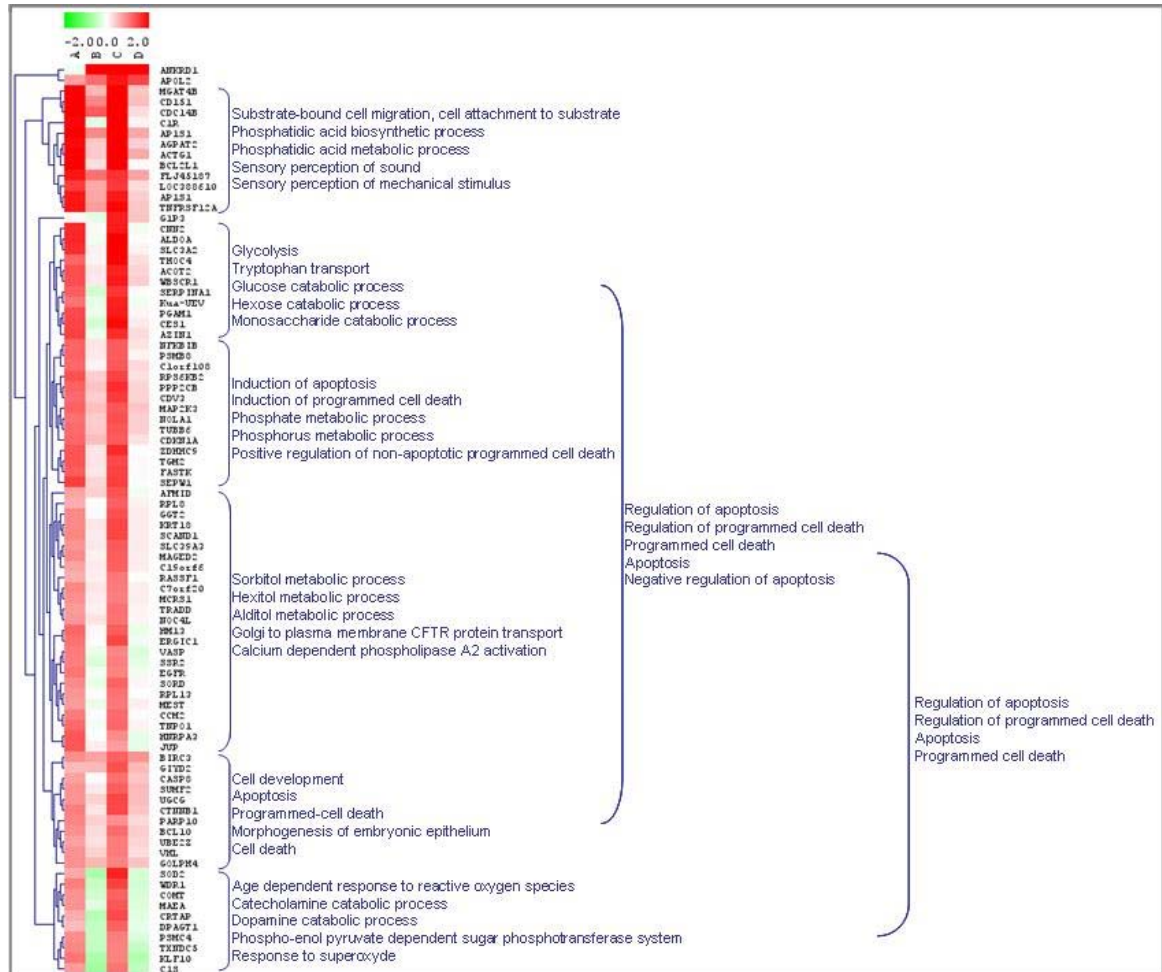
Nous avons également soumis cette même liste de gènes au moteur DAVID, mais ce ne sont que des GO\_TERMS très généraux comme « regulation of biological process » ou « regulation

of cellular process » qui apparaissent pour la majorité des gènes, avec 64 et 61 gènes sur les 125 identifiés par DAVID avec des valeurs p de  $2.4^E-08$  et  $8.3^E-07$  respectivement. On retrouve 31 gènes associés à « response to stimulus » avec une valeur p de  $2.1^E-02$ . Le GO\_TERM « immune system process » ne concerne que 19 gènes avec une valeur p de  $8.7^E-04$ . On retrouve également les GO-TERM « cell communication » et « signal transduction » pour 46 et 43 gènes, avec des valeurs p de  $2.7^E-04$  et  $3.0^E-04$  respectivement. Finalement, 15 gènes sont associés au GO\_TERM « apoptosis » avec une valeur p de  $8.9^E-04$ .

Le moteur KEGG\_PATHWAY a identifié 9 gènes appartenant à la voie de signalisation « Cytokine-cytokine receptor interaction » avec une valeur p de  $2.7^E-03$ , 6 gènes à la voie « toll-like receptor signaling pathway » avec une valeur p de  $2.8^E-03$  et 4 gènes « p53 signaling pathway » avec un p de  $2.8^E-02$ .

### **3.3 Effet majeur de la NS3/4A sur les voies apoptotiques au cours de la réponse immunitaire innée induite par l'ARNdb extracellulaire**

Nous avons mis en évidence que contrairement avec ce qui avait été obtenu avec la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire, les gènes interférés par la protéase au cours de la stimulation de la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire ne sont pas majoritairement associés à la réponse immunitaire antivirale destinée à éradiquer le virus. Nous nous sommes donc intéressés au cluster 1, qui regroupe des gènes induits en présence de la NS3/4A de façon protéolytique-dépendante. Afin d'identifier quelles catégories fonctionnelles de gènes étaient les plus représentées dans ce cluster, nous avons soumis cette liste de gènes au programme TEASE de MeV. Nous avons obtenu, comme indiqué à la **Fig. 7**, un large groupe de gènes dont les fonctions biologiques sont apparentées à la régulation de l'apoptose, à l'apoptose, à la régulation de la mort cellulaire ou encore à la régulation négative de l'apoptose.



**Figure 7 :** Variation d'expression génique après stimulation d'hépatocytes primaires humains normaux avec de l'ARNdb extracellulaire en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061

Résultats de l'analyse transcriptionnelle et classification fonctionnelle des 87 gènes différemment induits après stimulation de la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire en présence de NS3/4A avec ou sans BILN2061 sélectionnés à partir du cluster 1 de la Fig. 3. Le graphique a été produit en soumettant la liste de gènes à l'outil permettant un clustering hiérarchique (HCL clustering). Les données concernant les fonctions biologiques ont été obtenues via l'outil TEASE. Les différences d'expression sont visualisées par des différentes nuances de couleur. Chaque case de couleur correspond à une intensité du ratio d'expression (voir échelle). Les ratios d'expression ont été calculés en soustrayant le bruit de fond obtenu par les inductions pour les différents gènes avec le lentivirus contrôle. La couleur rouge indique une abondance relative augmentée du transcrit comparée à la moyenne d'expression de ce même gène en présence du vecteur lentiviral contrôle, alors que la couleur verte indique une diminution d'abondance relative du transcrit; la couleur blanche représente les niveaux obtenus pour le contrôle. Les gènes sont présentés individuellement le long de l'axe vertical, alors que les colonnes indiquent en A les niveaux d'expression en présence de NS3/4A après 3 hrs de stimulation, en B en présence de NS3/4A + BILN2061 après 3 hrs de stimulation, en C en présence de NS3/4A après 6 hrs de stimulation, et en D après 6 hrs de stimulation en présence de NS3/4A+BILN2061.

Nous avons également soumis cette même liste de gènes au programme DAVID afin d'identifier des GO\_TERMS spécifiques associés à ces gènes. Sur les 85 gènes identifiés par DAVID, on constate, comme ce qui avait été observé avec TEASE, que 18 gènes sont directement associés aux termes « cell death », « apoptosis » et « programmed cell death » avec des valeurs p respectivement de  $2.1^E-07$ ,  $8.8^E-08$  et  $1.0^E-07$ . On note également les GO\_TERMS « regulation of apoptosis » et « regulation of programmed cell death » pour 15 gènes, avec des valeurs p de  $1.7^E-07$  et  $1.9^E-07$ . La soumission de cette même liste au moteur permettant d'associer des voies de signalisation à une liste de gènes indique que 4 gènes sont associés à une voie de signalisation apoptotique, avec une valeur p de  $3.6^E-02$ . À la lumière de ces résultats particulièrement intéressants, nous avons sélectionné certains gènes d'intérêt dont les niveaux d'expression sont induits à la fois après 3 hrs et 6 hrs de stimulation, et qu'il serait important de confirmer en PCR quantitatif (**Tableau 3**).

**Tableau 3:** Exemples de niveaux d'induction de gènes interférés par NS3/4A et rétablis par BILN2061 après stimulation de la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire

gene information		cluster	Fold change after 3hrs edsRNA stimulation			Fold change after 6hrs edsRNA stimulation			functional information
Gene symbol	gene ID	Num	ctr	NS3/4A	NS3/4A+B	ctr	NS3/4A	NS3/4A+B	GO_TERM
SOD2	6648	1	2.98	4.77	1.90	3.32	11.13	2.66	apoptosis, regulation of apoptosis, negative regulation of apoptosis
G1P3	2537	1	1.61	1.65	1.40	1.56	5.30	2.15	apoptosis, regulation of apoptosis, negative regulation of apoptosis
TGM2	7052	1	-1.11	2.30	1.04	1.54	4.16	1.59	regulation of programmed cell death
CASP8	841	1	-1.06	1.58	-1.03	1.50	3.27	2.03	apoptosis, regulation of apoptosis
PPP2CB	5516	1	-1.12	2.09	1.23	1.01	3.15	1.27	regulation of programmed cell death
BCL2L1	598	1	-1.80	2.63	-1.51	-1.68	3.00	-1.63	apoptosis, regulation of apoptosis, negative regulation of apoptosis
BCL10	8915	1	1.42	2.62	1.74	1.25	2.78	1.64	apoptosis, regulation of apoptosis, negative regulation of apoptosis
FASTK	10922	1	-1.20	2.02	-1.05	-1.07	2.60	1.03	apoptosis, regulation of apoptosis
CXCL9	4283	2	8.78	7.03	9.90	15.12	9.20	12.51	response to stimulus, immune system process
OAS3	4940	2	1.82	1.72	1.73	7.04	3.60	5.40	response to stimulus, immune system process

Les niveaux d'induction sont calculés dans chaque condition relativement aux valeurs obtenues avant la stimulation. Les valeurs obtenues pour le contrôle (ctr) représentent les niveaux d'induction obtenus en présence du vecteur lentiviral vide, les deux autres conditions étant en présence du vecteur lentiviral codant pour la protéase NS3/4A avec ou sans BILN2061. Les GO\_TERMS associés à chacun de ces gènes ont été obtenus après soumission de la liste de gènes appartenant aux clusters 1 et 2 (voir Fig.3) au programme en ligne DAVID. Des exemples de gènes appartenant à différentes catégories fonctionnelles sont présentés. Les clusters auxquels les différents gènes appartiennent sont indiqués.

## 4. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons démontré que dans des hépatocytes primaires exprimant la NS3/4A de façon ectopique, cette dernière pouvait affecter de nombreux gènes appartenant à différentes catégories fonctionnelles selon le type de stimulation effectuée, et ce, de façon dépendante de sa fonction protéolytique. Nos données suggèrent très clairement qu'au cours d'une stimulation de la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire (ARNdb transcrit *in vitro* ou poly(I:C)), la protéase virale joue un rôle majeur d'interférence avec la réponse immunitaire antivirale. Par ailleurs, nous avons également relevé un aspect intéressant concernant le rôle de la NS3/4A sur les catégories fonctionnelles associées à la régulation de l'apoptose ainsi que celle du programme de mort cellulaire. En ce qui concerne la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire passant par TLR3, nos données suggèrent fortement que la NS3/4A est également impliquée dans la régulation d'évènements apoptotiques. Dans cette section, nous nous pencherons donc plus particulièrement sur un phénomène-clé à considérer au cours d'une infection virale : la régulation potentielle de l'apoptose par le VHC.

La réponse immunitaire contre une infection virale inclut à la fois différents composants du système de l'immunité innée, mais aussi de l'immunité acquise. L'activation de ces deux systèmes aboutit à l'apoptose, phénomène largement répandu comme réponse à une infection virale. Le système immunitaire inné agit comme première ligne de défense en activant directement les cellules inflammatoires comme les macrophages ou encore les cellules NK pouvant rapidement causer la mort des cellules infectées. D'un autre côté, l'ARN ou les protéines virales peuvent interagir avec des molécules intracellulaires de l'hôte à l'origine de la modulation ou de l'induction de la mort cellulaire (Balachandran et al., 2000). La fonction potentiellement apoptotique de la voie de signalisation médiée par RIG-I/CARDIF a récemment été proposée suite à l'observation que la transfection d'ARN 5'PPP et de poly(I:C) induisait l'apoptose de façon dépendante de CARDIF dans des cellules humaines de mélanome (Besch et al., 2009). Le rôle pro-apoptotique de CARDIF, qui est dépendant de sa localisation mitochondriale a également été confirmé par le fait qu'une diminution de son expression engendre à la fois une baisse de la cytotoxicité ainsi qu'une activation de la caspase-3 effectrice au cours d'une infection avec DEN-2 ou d'une stimulation avec de l'ARNdb.

Il est suggéré que CARDIF active la caspase 8 en interagissant avec FADD et TRADD puis qu'il induise la cascade des caspases menant à l'activation des caspases effectrices -3 et -9 (Yu et al., 2010). De plus, de façon intéressante, la capacité de CARDIF à induire l'apoptose dépend de sa

localisation mitochondriale et se fait de façon indépendante à IRF3. Dans le cadre d'une infection avec le virus de Dengue qui est un Flaviviridae, il a été suggéré que CARDIF participe de deux façons à l'immunité innée : dans un premier temps, CARDIF est impliqué dans la production d'IFN, et au cours de la phase plus tardive, CARDIF médie la mort cellulaire (Courageot et al., 2003). Cette stratégie cellulaire est efficace dans la mesure où l'induction de l'IFN et de l'apoptose par CARDIF permet aux cellules environnantes d'entrer dans un état antiviral, et à la cellule infectée d'entrer en apoptose. En effet, il a été démontré que dans le cas du virus de la Dengue, la mort cellulaire et l'induction des caspases ont lieu plus tard dans l'infection.

Dans ce contexte, nos données sont particulièrement intéressantes dans la mesure où elles reflètent clairement que lorsque la voie médiée par RIG-I est activée (ARNdb transcrit *in vitro* et poly(I:C) transfectés), nous avons observé en présence du vecteur lentiviral vide, une forte induction de TRAIL, un élément-clé au cours du processus apoptotique. En présence de la protéase virale NS3/4A, on retrouve une diminution significative de l'expression de ce gène, alors qu'en présence de l'inhibiteur de protéase, les niveaux de TRAIL initiaux sont rétablis. Or, rappelons que l'expression de NS3/4A induit le clivage de CARDIF, et sa délocalisation de la membrane mitochondriale. Ainsi, l'activité protéolytique de NS3/4A dans un contexte où la voie médiée par RIG-I -la voie de reconnaissance du VHC- est activée, diminue l'induction de l'apoptose, ce qui va, en l'occurrence, en faveur du virus.

La complexité de la réponse de l'hôte à l'infection chronique avec le VHC a fait l'objet de plusieurs analyses transcriptomiques à partir d'échantillons de biopsies de foies provenant de patients ou de chimpanzé. Ces études ont montré que le VHC induisait à la fois des gènes impliqués dans la réponse IFN, le métabolisme lipidique, le stress oxydatif, les chemokines ainsi que les marqueurs d'inflammation (Bigger et al., 2004; Smith et al., 2003). Par exemple, il a été démontré que les patients chroniquement infectés avec le VHC présentaient de plus hauts niveaux de ligands associés à la mort cellulaire, comme TRAIL, TNFa, FAS et FASL (Mundt et al., 2005; Pianko et al., 2001; Riordan et al., 2006). Or jusqu'à récemment, on pensait que le VHC était un virus non cytolytique et que les dommages causés à l'hépatocyte au cours d'une infection chronique étaient principalement dus aux réponses immunitaires adaptatives (Kanto et Hayashi, 2006; Lau et al., 1998; Nelson, 2001). Étant donné qu'il est difficile d'identifier les hépatocytes infectés, il n'a toujours pas encore été déterminé si les hépatocytes en apoptose sont ceux qui sont réellement infectés ou simplement ceux localisés à proximité de cellules immunitaires. Cela dit, les résultats obtenus avec le modèle de la souris SCID transgénique sans système immunitaire acquis ont démontré une induction d'apoptose dans les foies de ces souris de façon similaire à ce qui avait été



observé dans les foies des patients chroniquement infectés avec le VHC (Walters et al., 2006a). Il est donc maintenant de plus en plus accepté que les effets cytopatiques observés ne sont pas uniquement liés à la réponse immunitaire cellulaire, mais que certains sont aussi directement associés au virus.

Dans un contexte où l'on stimule la voie TLR3, une panoplie de gènes majoritairement reliés à l'apoptose sont fortement induits, et ce, de façon protéase-dépendante, puisqu'un traitement avec BILN2061 rétablit les niveaux à ceux obtenus avec le vecteur vide. De plus, cette activation n'est pas dépendante de NS3/4A uniquement puisqu'au temps  $t=0$ , avant induction de la voie TLR3, l'expression de NS3/4A n'induit pas spécifiquement de gènes reliés à l'apoptose. C'est donc réellement dans le cadre d'une stimulation de la voie médiée par de l'ARN extracellulaire, que nous avons observé cette variation. Il semblerait donc qu'au cours de ce type de stimulation, la NS3/4A aurait plutôt un effet pro-apoptotique en augmentant l'expression de gènes comme *BCL10*, *BCL2L1* ou *CASP8*. En effet, le gène *BCL10* code pour une protéine contenant un domaine de recrutement de caspase (CARD) et aurait une fonction pro-apoptotique et interagirait avec d'autres protéines contenant un domaine CARD, comme CARD9, 10, 11 et 14 agissant en amont de NF $\kappa$ B comme protéines régulatrices. La protéine BCL2L1 quant à elle, également induite au cours de l'activation de la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire en présence de NS3/4A appartient à la même famille que la protéine BCL2, et agit comme régulatrice anti ou pro-apoptotique. Les protéines de cette famille sont localisées dans la membrane mitochondriale externe et auraient un rôle dans la régulation de la production d'espèces réactives à l'oxygène ainsi que dans le relâchement du cytochrome C par la mitochondrie, éléments largement impliqués dans l'induction de l'apoptose cellulaire. Nous avons également remarqué toujours dans le cadre d'une stimulation de la voie médiée par le TLR3, une induction de l'expression de *SOD2*, un gène codant pour une protéine mitochondriale interagissant avec les produits superoxyde générés par la phosphorylation oxydative et donc largement impliquée dans la régulation du stress oxydatif.

Jusqu'à récemment, l'absence d'un système infectieux ne permettait pas l'étude de l'impact de l'infection avec le VHC sur l'apoptose dans les hépatocytes. Globalement, les données sur les différents rôles des protéines du VHC sont controversées et soutiennent à la fois des effets pro et anti-apoptotiques dépendamment du système expérimental utilisé. Dans la mesure où dans la majorité des modèles d'expression de protéines virales ces dernières sont surexprimées, un effet pro-apoptotique a souvent été décrit; par ailleurs, en plus des conditions non physiologiques d'expression, ces modèles ne bénéficient pas de l'expression de l'ensemble de la polyprotéine virale ainsi que des différentes interactions qui en découlent. D'ailleurs, chez un même patient, différentes

protéines Core provenant de quasi-espèces et exprimées seules dans un modèle hépatocytaire *in vitro* ont à la fois des effets pro- et anti- apoptotiques (Pavio et al., 2005). Dans notre cas, il est envisageable que certains des effets pro-apoptotiques que nous avons observés en particulier au cours de la stimulation de la voie médiée par le TLR3, soient liés à la surexpression de NS3/4A, un biais de notre technique.

À la lumière de nos résultats, il serait donc intéressant d'approfondir ce concept, plus particulièrement dans un contexte où la polyprotéine complète est exprimée (système infectieux *in vitro*), ou encore dans des hépatocytes chroniquement infectés avec le VHC. Il serait important de vérifier l'activité des caspases dans nos échantillons de patients mais aussi de les valider dans un système dans lequel NS3/4A est exprimée de façon plus physiologique, comme le JFH-1 dans des hépatocytes primaires. Le rôle de NS3/4A dans la régulation de l'apoptose dans le contexte inflammatoire est donc un volet d'étude extrêmement intéressant à poursuivre, dans la mesure où l'on sait également que la régulation des voies apoptotiques a un rôle crucial à la fois pour l'établissement de la persistance virale, mais aussi dans celui d'un état fibrotique puis cirrhotique chez un patient chroniquement infecté avec le VHC. En effet, les dommages hépatiques et l'apoptose jouent un rôle-clé au cours du recrutement et de l'activation des cellules stellaires et des macrophages impliqués dans le développement de la fibrose et donc de la pathogénèse de l'infection avec le VHC (Bataller et Brenner, 2005; Canbay et al., 2002).

## **CHAPITRE 4: Article 2**

### **Characterization of the Antiviral Response in Liver Biopsies and Purified Hepatocytes from Chronically HCV-infected Patients**

## 1. Mise en contexte et présentation

Dans notre premier article, nous avons validé la fonctionnalité des voies de détection de l'ARNdb dans des hépatocytes primaires humains normaux. Nous avons également démontré que la protéase virale NS3/4A interfère de façon majeure avec la réponse antivirale médiée par RIG-I, et ce dans des hépatocytes primaires humains normaux exprimant NS3/4A de façon ectopique.

Dans ce deuxième article, nous avons abordé la question de la réponse antivirale au VHC dans le contexte de l'infection chronique. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1 avec la présentation de l'histoire naturelle de l'infection avec le VHC, la persistance virale est une conséquence chez plus de 50% des individus infectés. Par ailleurs, il est maintenant de plus en plus clairement établi que des patients chroniquement infectés avec le VHC présentent une forte induction d'ISGs au niveau du foie. Le même phénomène quelque peu contre-intuitif a également été observé dans des biopsies de foies provenant de chimpanzés et de souris chroniquement infectés avec le VHC.

En effet, étant donné que les stratégies de subversion de l'immunité innée par la protéase NS3/4A aboutissent comme nous l'avons vu, à un blocage de la cascade de signalisation de la voie médiée par RIG-I, récepteur intracellulaire du VHC, dû au clivage de son adaptateur CARDIF, on pourrait s'attendre à une réponse antivirale de l'hôte faible ou inexistante. D'un autre côté, il est également difficile de comprendre comment le virus perdure dans un environnement hostile puisque qu'une réponse antivirale est en cours.

De prime abord, nous avons voulu confirmer l'état activé du système immunitaire inné dans les biopsies de foies infectés. Disposant des hépatocytes purifiés à partir de ces biopsies, nous nous sommes également intéressés à la contribution éventuelle de ces hépatocytes dans cette réponse. En effet, la participation des hépatocytes, cibles de choix du VHC, a régulièrement été remise en question dans la mesure où les infiltrats de cellules immunitaires dans le foie infecté sont relativement abondants et pourraient correspondre à une source importante d'IFN $\alpha/\beta$ . Effectivement, un des grands débats soulevés depuis l'utilisation des biopsies pour l'étude à l'échelle du transcriptome d'une réponse antivirale dans le foie, repose sur le fait que ces dernières contiennent 20% de cellules qui ne sont pas des hépatocytes.

La collaboration avec le Dr Bilodeau et son équipe, nous a permis d'avoir accès à des biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC, ainsi qu'aux hépatocytes isolés de ces mêmes biopsies. Grâce à ce protocole unique d'isolation des hépatocytes, il fut donc possible

de confirmer premièrement qu'il y a bien une réponse antivirale dans des biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC, et deuxièmement, que cette réponse provient bien des hépatocytes. Nous nous sommes également intéressés à mieux caractériser cette réponse antivirale, en tentant de retrouver une signature de l'activation des voies de détection de l'ARNdb, un aspect que nous avons abordé dans l'article 1. De façon très intéressante, nous avons confirmé l'induction de certains gènes inductibles à l'IFN, comme les *ISG15* et *ISG56*, sans pour autant détecter certains gènes antiviraux-clé, comme les *IFN $\beta$*  et les *IFN $\lambda_{1,2,3}$*  ou la chémokine *CCL5*, qui sont pourtant une signature de l'activation de la voie médiée par RIG-I au cours de la réponse antivirale précoce.

D'autre part, nous avons démontré une diminution de CARDIF dans ces hépatocytes primaires provenant de patients chroniquement infectés avec le VHC dans lesquels nous avons également détecté la protéase NS3/4A. Nous avons obtenu des corrélations négatives significatives entre les niveaux d'ISGs dans les biopsies et l'ARN viral que nous avons quantifié, impliquant donc des phénomènes d'interférence virale sous-jacents.

Ces données sont particulièrement intéressantes dans la mesure où l'on sait que le traitement de choix pour l'infection avec le VHC repose sur l'administration d'IFN pégylé combiné à de la ribavirine destiné à stimuler une réponse antivirale supposée inexistante ou négligeable chez ces patients. Or ce traitement échoue dans 50% des cas. D'autre part, il fut très récemment démontré qu'il existe une relation entre les niveaux d'ISGs déjà présents avant le traitement IFN chez les patients infectés et la résolution de l'infection : plus les niveaux d'ISGs sont élevés chez les patients chroniquement infectés avec le VHC avant le traitement, moins il y a de chance que le traitement fonctionne. Dans ce contexte, nous remettons en perspective les stratégies antivirales du VHC ainsi que la réponse de l'hôte à l'infection, deux éléments fondamentaux pour une meilleure compréhension de l'interaction virus-hôte dans le cadre d'une infection chronique avec le VHC.

## **2. Contributions de la candidate**

La candidate a effectué l'isolation de l'ARN total des biopsies et hépatocytes primaires purifiés ainsi que la mise au point et l'ensemble des RT-PCRs quantitatifs. La candidate a également analysé les données et effectué les corrélations. La candidate a également été responsable de la rédaction de l'article ainsi que de la conception des figures.

## Characterization of the Antiviral Response in Liver Biopsies and Purified Hepatocytes from Chronically HCV-infected Patients

Loubna Jouan<sup>1,4</sup>, Laurent Chatel-Chaix<sup>1,8</sup>, Pierre Melançon<sup>1,8</sup>, Ian-Gaël Rodrigue-Gervais<sup>1,5</sup>, Valerie-Ann Raymond<sup>2</sup>, Subajini Selliah<sup>2</sup>, Marc Bilodeau<sup>2,6</sup>, Nathalie Grandvaux<sup>3,7</sup> and Daniel Lamarre<sup>1,6,8\*</sup>

Laboratoire d'immunologie virale<sup>1</sup>, Laboratoire d'hépatologie cellulaire<sup>2</sup>, Laboratoire de signalisation et infections virales<sup>3</sup>, Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada, H2X 1P1.

Département de Sciences Biomédicales<sup>4</sup>, Département de Microbiologie et Immunologie<sup>5</sup>, Département de Médecine<sup>6</sup>, Département de Biochimie<sup>7</sup>, Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie<sup>8</sup>, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

\* **Correspondence** : Daniel Lamarre, CRCHUM, Hôpital St-Luc, 264 René Levesque-Est, PEA 312, Montréal, Qc, CA, H2X 1P1; Tel : (1) 514 890 8000 #35258;

**Keywords:** HCV, primary hepatocytes, interferon stimulated genes (ISGs), NS3/4A, viral interference.

**Running title:** Antiviral response in chronically HCV-infected patients

**Abbreviations:** CARDIF: CARD-adaptor Inducing IFN $\beta$ ; CHC: Chronic Hepatitis C; dsRNA: double-stranded Ribonucleic Acid; HCV: Hepatitis C Virus; IFN: Interferon; IFNAR: Interferon receptor; ISG: Interferon Stimulated Gene; NEMO: NF $\kappa$ B-Essential modulator; NS3/4A: Non Structural proteins 3 and 4A; PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern; PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells; pDC: plasmacytoid Dendritic Cell; PRR: Pathogen Recognition Receptor; TLR: Toll-Like Receptor; TRAF: Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor; RIG-I: Retinoic acid Inducible Gene-I; 3'UTR: 3' Untranslated Region.

**Fundings:** The present work was supported by a graduate studentship grant to LJ by the Canadian Liver Foundation, by the Michel Saucier postdoctoral fellowship (Canadian Pasteur Foundation) to LCC and by the Novartis/Canadian Liver Foundation Hepatology Research Chair to DL.

## Abstract

Innate sensing of viral infection is initiated when double-stranded RNA (dsRNA) is recognized by the host cell that subsequently activates global defense response including type I interferon (IFN) and IFN-stimulated genes (ISGs) expression. HCV NS3/4A protease, an essential protein in viral polyprotein processing, can disrupt antiviral signalling pathways by cleaving RIG-I adaptor CARDIF when ectopically expressed in normal human primary hepatocytes; however, whether NS3/4A protease mediates evasion of innate immunity in chronically HCV-infected hepatocytes, remains unclear. Paired liver biopsies and corresponding purified primary hepatocytes from 16 chronically HCV-infected patients and 11 normal patients were collected and were subjected to transcriptional analysis by quantitative qRT-PCR. Here, we report for the first time, an upregulation of key antiviral genes (e.g. *ISG15*, *ISG56*, *OASL*) in both liver biopsies and corresponding isolated primary hepatocytes from chronically HCV-infected patients, supporting the fact that an active antiviral response is induced, and that this response is largely supported by primary hepatocytes. However, in addition to a global decrease of CARDIF adaptor in hepatocytes isolated from HCV-infected biopsies, we obtained clear and significant inverse correlations between four major ISGs (*ISG15*, *OASL*, *IFIT1* and *DDX58*) and HCV RNA in infected biopsies, unraveling the existence of viral interfering strategies by HCV. Moreover, we also report a severely compromised expression of IRF3-dependent genes (e.g. *IFN $\beta$* , *CCL5*) whereas the induction of IFN-dependent genes is preserved thus arguing for viral-derived strategies to counteract an efficient antiviral response by the host without completely impairing the battery of genes induced by the classical interferon pathway.

**Abstract:** 250 words

**Keywords:** Hepatitis C virus; Primary hepatocytes; NS3/4A; Interferon stimulated genes; Viral interference

## Introduction

The Hepatitis C virus (HCV) is one of the leading causes for a progressive liver disease resulting in mild to severe hepatic inflammation causing fibrosis, cirrhosis and eventually hepatocarcinoma. One of the most important features of HCV is its tendency towards chronicity in more than 70% of infected patients depending on the genotype (17). The current anti-HCV therapy based on pegylated interferon (PEG-IFN $\alpha$ ) in combination with ribavirin leads to viral eradication in only half of chronically HCV-infected patients (42).

Following PRRs-mediated recognition of nucleic acids which is a well-known PAMP for virus, an immediate-early phase of the antiviral response is triggered by the host leading to the synthesis of numerous antiviral genes and to the establishment of a hostile environment for virus replication and spreading. HCV RNA is a potent inducer of the host innate immune response and is recognized by RIG-I and TLR3. Saito et al. have recently established that RIG-I-mediated intracellular HCV RNA recognition involves both its 5'PPP uncapped end and its 3'UTR poly-U/UC genomic motif (37). Following RIG-I activation and CARDIF - its main adaptor-dimerization, TRAF3 and TRAF6 subsequent recruitments lead to TBK1/IKK $\epsilon$  and IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ /NEMO complexes activation, respectively (4, 20, 28, 36, 40, 44, 48). This ultimately leads to key transcriptional activators, IRF3 and NF $\kappa$ B, import into the nucleus and to the synthesis of major antiviral genes such as type I interferons, Interferon Stimulated Genes (ISGs) such as *OASL*, *ISG15* and *ISG56*, chemokines such as *CXCL9*, *10*, *11* and *CCL5*, and of pro-inflammatory cytokines. Extracellular HCV RNA sensing by the host cell can also be triggered by TLR3 that mediates downstream signaling via the recruitment of its main adaptor TRIF and leads to IRF3 and NF $\kappa$ B activation. The pathways triggered by RIG-I and TLR3 both converge to TRAF3-TBK1/IKK $\epsilon$  activation (11, 18, 29, 32, 39).

Although the contribution of TLR3 to antiviral innate immunity during HCV infection is still controversial, it has recently been demonstrated that TLR3 expressed in the hepatic cell line Huh7 was able to respond to HCV and to restrict infection in a RIG-I-independent manner (47).



Following the initiation of this early phase of pathogen detection, secreted IFN $\beta$  subsequently stimulates at the autocrine and paracrine levels the classical IFN signaling pathway through IFNAR recognition and JAK/STAT activation. This drives the synthesis of ISGs (e.g. *ISG15*, *ISG56* and *OASL*) as well as a positive loop of amplification of the initial signal due to the upregulation of PRRs and transcriptional activators, hence promoting the host's defense.

It is now largely accepted that one of the main causes of HCV persistence is related to its capacity to subvert the host's innate immune mechanisms. HCV protease NS3/4A interferes with the host's nucleic acids detection systems by cleaving major antiviral pathways adaptors –CARDIF and TRIF- resulting in the disruption of the innate immune defense (8, 10, 24-27, 30). However, we recently demonstrated a preferential abrogation of the intracellular dsRNA-induced pathway by HCV NS3/4A protease ectopically expressed in primary hepatocytes. This interference was demonstrated to be mediated by NS3 protease activity since complete restoration of the pathway following specific NS3 inhibitor BILN2061 treatment was achieved. TLR3-mediated pathway was affected to a lesser extent in NS3/4A expressing hepatocytes and in a protease-independent manner (19).

Despite HCV strategies to circumvent the host's antiviral response, transcriptome analysis of liver biopsies from chronically HCV-infected patients and from chimpanzees undergoing experimental HCV infection have revealed a strong on-going antiviral response with high induction levels of ISGs (6, 7, 16, 21, 22, 41, 43). However, there are more and more evidence that no direct and intuitive correlation exist between these high levels of ISGs and viral elimination. This observed antiviral response could originate either from newly infected hepatocytes that detect viral RNA or respond to paracrine secreted interferon, or from the augmented immune cell infiltration, in particular pDCs which are professional interferon producing cells. Moreover, it has been shown that HCV-specific T lymphocytes are the predominant cell population infiltrating the liver and could represent a source of IFN (15). Lau et al. recently have recently examined the relationship between the IRF3 activation status in chronically HCV-infected hepatocytes, the ISG expression in the

whole biopsies and the immune cell infiltration. It was demonstrated that only a small proportion of hepatocytes express nuclear active form of IRF3 and that the infiltrated pDCs serve at least partially, as a paracrine source of IFN production hence driving an ISG response by non-infected hepatocytes (22). However, augmented ISGs expression levels were also obtained in the model of humanized immunodeficient SCID-mouse experiencing HCV infection, hence putting into doubt immune cells participation in this observed antiviral response (46).

Bellecave et al. provided evidence that CARDIF cleavage observed in almost half of chronically HCV-infected patients liver biopsies positively correlates with viral load and negatively correlates with the upregulation of ISGs in chronically HCV-infected livers (5). Moreover, it was demonstrated that elevated ISG levels observed in the livers of chronically HCV-infected patients positively correlate with p-STAT1 staining in hepatocytes, hence corresponding to an activated classical IFN pathway in hepatocytes. Until now, the exact source of ISGs upregulation in chronically HCV-infected livers remains to be identified. Globally, HCV is able to simultaneously trigger and control the host's antiviral defense mechanisms during the course of chronic infection of the liver.

In this study, we first confirmed the activation of the immune innate system in the liver of chronically HCV-infected patients. In order to unravel the possible sources of this observed hepatic antiviral response, we quantified ISGs and chemokines induction levels in chronically HCV-infected biopsies and corresponding purified hepatocytes. Surprisingly, we detected high levels of ISGs mRNAs in isolated primary hepatocytes from chronically HCV-infected patients, supporting the fact that an active antiviral response is largely triggered by these cells despite being the main cell target of HCV. Because this persistent infection is thought to be related to viral interfering activities, we evaluated CARDIF cleavage, ISGs mRNA and viral RNA levels in different HCV-infected biopsies and corresponding purified hepatocytes. For the first time, in addition to a significant diminution of CARDIF expression in purified hepatocytes from HCV-infected patients, we demonstrated a significant inverse correlation between ISGs mRNA levels and viral RNA,

hence revealing strong interfering activities by the virus most probably related to its NS3/4A proteolytic function. We hypothesize that despite ISGs persistent induction linked to paracrine produced interferon and a functional classical interferon pathway in CHC livers, a defective early innate immune response linked to CARDIF cleavage in primary hepatocytes causes irreversible defaults such as impairment of strictly IRF3 and NF $\kappa$ B-dependent genes induction. The classical interferon pathway being already activated, this could also explain why interferon-based therapies are largely inefficient in more than half of chronically infected patients, a fact that underlies the emergency to combine both an interferon-based therapy and a more specific antiviral treatment aiming at suppressing viral interfering activities.

## Materials and Methods

### Liver Biopsies and Patients Data

Normal biopsies were obtained from healthy peritumoral liver tissues of patients undergoing partial hepatectomy for hepatic tumors (benign or metastatic). Biopsies from chronically HCV-infected patients were from end stage cirrhotic livers obtained at the time of transplantation. Portions of liver transplants from 11 non-infected patients and 19 patients with chronic Hepatitis C infection were selected for our study (Tables 1 and 2). Normal and HCV-infected biopsies processing and purification of primary hepatocytes by collagenase perfusion were carried out as previously described (34). None of the patients studied had serological evidence of coexisting HIV and HBV infections. All procedures followed were in accordance with the ethical commission of the CHUM, Hôpital St-Luc, Montréal, Canada and with the Helsinki Declaration.

### Intrahepatic ISGs mRNA levels quantification

Before RNA extraction, liver tissues were homogenized by grinding to a fine powder under liquid nitrogen. Lysis buffer was added and lysates were passed through a 20-gauge needle. For purified hepatocytes, pellets of cells were also homogenized in lysate buffer and passed into a 20-gauge needle. Total cellular RNA was extracted using Rneasy Mini kit (Qiagen, Mississauga, Ontario) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed on 500ng total cellular RNA using the QuantiTect RT kit (Qiagen). Real time PCR DNA amplification was performed on 5ng of cDNA using SyBRgreen PCR master mix (Qiagen) in presence of 0.5  $\mu$ M specific primers (listed in Table S1) for *ISG15*, *ISG56*, *OASL*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CCL5*, *DDX58*, *IFN $\beta$* , *IFN $\lambda$ 2* mRNAs. For housekeeping genes, we used *S9* and *HMBS* that have been determined to be the most stable and expressed at low levels in liver and have been characterized as the most representative genes to allow normalization of the samples (45). For each liver biopsy and corresponding isolated primary hepatocytes sample, the difference in the cycle threshold ( $\Delta$ Ct) value was determined by subtracting the Ct value for the transcripts of interest, from the Ct value of

the normalizing genes (mean between *S9* and *HMBS*) designed as internal controls. Messenger RNA expression levels were calculated relative to the housekeeping genes mean following transformation to relative quantities using the formula  $2^{\Delta Ct}$ , where the two represents an optimal theoretical efficiency of PCR amplification in the Rotor Gene apparatus. All reactions were run in duplicate, using a Rotor-Gene 3000 Real Time Thermal Cycler (Corbett Research, Mortlake, Australia). A control reaction without RT was performed on each run.

### **Intrahepatic HCV RNA quantification**

For HCV RNA relative quantification, a two-step amplification protocol was optimized as previously reported (35). We added to the first RT-PCR mix the *S9* reverse primer for the RT step as an internal control, and an aliquot of cDNA was taken before the 18-cycles pre-amplification step. The next 40-cycles amplification step was performed using SYBR Green instead of fluorescent probes (Qiagen). The difference in the cycle threshold value ( $\Delta Ct$ ) was derived by subtracting the Ct value for HCV transcript, from the Ct value of *S9* and *HMBS* designed as internal control. All reactions were run in duplicate, using a Rotor-Gene 3000 Real Time Thermal Cycler (Corbett Research, Mortlake, Australia). A control reaction without RT was performed on each run for internal controls. Messenger RNA expression levels were calculated relative to the mean of *S9* and *HMBS* from the  $\Delta Ct$  values, using the formula  $2^{\Delta Ct}$ .

### **Immunoblot analysis**

Cells were lysed on ice during 20 min. in RIPA buffer (PBS with 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease inhibitors (Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and then centrifuged for 10 min. at 10 000g. Protein concentration was determined by using Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA) and equal amounts of proteins were resolved on a 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and transferred on a nitrocellulose membrane (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad). The membranes were blocked with PBS containing Tween-20 0.1% (PBST) and 10% non-fat dry milk

for 1 hour, and then probed 3 hours with rabbit anti-CARDIF (AT107) (1:5000, Alexis Biochemicals, San Diego, CA), monoclonal anti-NS3 (1:1000, ABCAM, Cambridge, MA), mouse anti- $\beta$ -actin antibody (MAB1501) (1:10000, Chemicon International, Temecula, CA) or monoclonal Mouse anti-human Hepatocyte antibody (Clone OCH1E5) (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) in PBST 1% milk at room temperature. After PBST washes, membranes were incubated for 1 hour in HRP-conjugated goat anti-rabbit (1:3000) (Bio-Rad) or HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (1:3000) (Bio-Rad) in PBST 1% milk, washed and developed with Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Shelton, CT). Protein extracts from human hepatocytes transduced with empty or NS3/4A-expressing lentiviral vector were used as controls for NS3/4A expression and for CARDIF proteolytic cleavage as previously described (19).

### **Statistical Methods**

Correlations were assessed using the Spearman coefficient and comparisons between two groups (HCV-infected biopsies versus normal biopsies or normal hepatocytes versus HCV-infected hepatocytes) were performed with the Mann-Whitney test, using GraphPad Prism. A  $p \leq 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

### **Major Interferon Stimulated Genes are significantly upregulated in chronically HCV-infected liver biopsies and corresponding isolated primary hepatocytes**

Based on our genome-wide transcriptional profiling analysis performed on purified normal hepatocytes under defined conditions of dsRNA stimulation, we had previously provided a more comprehensive understanding of the global innate response in primary hepatocytes. We demonstrated that these cells were able to rapidly induce an antiviral immune response following extracellular and intracellular dsRNA challenges characterized by the induction of numerous and common antiviral genes such as ISGs (*IFIT1*, *ISG15*, *OASL*), chemokines (*CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11* and *CCL5*) and proinflammatory cytokines, but also *IFN $\beta$* , *IFN $\lambda$ 2* and *IFN $\lambda$ 3* which were specific for the intracellular dsRNA-activated pathway (19). In our present study, we choose some of these key antiviral response markers to assess if dsRNA-activated signaling pathways are functional *in vivo* in the context of a chronic HCV infection. We compared induction levels of these antiviral genes in liver biopsies from chronically HCV-infected patients removed at liver transplantation with those from normal liver biopsies. We also evaluated the antiviral response in purified primary hepatocytes from these chronically HCV-infected patient biopsies to clarify their contribution to the antiviral response. Indeed, in the context of a chronic HCV infection, the origin of an observed-immune response in a liver biopsy is a source of debate since contribution of immune cell infiltrates versus hepatocytes has still not been determined. The clinical characteristics of all chronically HCV-infected patients and normal controls that were part of this study are summarized in Tables 1 and 2.

By using quantitative PCR, we measured four selected ISGs mRNAs levels in 11 normal and 16 chronically HCV-infected biopsies and in corresponding isolated and purified hepatocytes. We

obtained a clear and significant induction of *ISG15*, *OASL*, *IFIT1* (encoding for ISG56) and *DDX58* (encoding for RIG-I) mRNAs in chronically HCV-infected biopsies (medians of 510, 59, 290 and 34) compared to our normal control biopsies (medians of 27, 5, 46 and 27) with p values <0.0001 for *ISG15* and *OASL* and p=0.0009 for *IFIT1* and 0.0167 for *DDX58* (Fig. 1). These results clearly show an ongoing innate immune response in HCV-infected biopsies.

To elucidate whether this increased ISGs expression in these heterogeneous liver biopsies was due to immune cells infiltration or another cell type in the liver, we measured these same ISGs mRNA levels in corresponding isolated primary hepatocytes. Very interestingly, medians obtained for the four ISGs mRNAs were very similar or even higher than those from biopsies, with medians of 584, 71, 314 and 44 for *ISG15*, *OASL*, *IFIT1* and *DDX58* respectively for HCV-infected hepatocytes compared to 37, 4, 67 and 13 for normal purified hepatocytes with low p-values (Fig. 1).

### **Chemokines CXCL9, CXCL10, CXCL11 and CCL5 are differentially induced in chronically HCV-infected biopsies and corresponding isolated hepatocytes**

We previously established by microarrays analysis that chemokines *CXCL10* and *CXCL11* were the two most induced genes in primary hepatocytes following both extracellular and intracellular dsRNA exposition. *CXCL9* and *CCL5* were also part of the top-30 most induced genes following TRIF and CARDIF-mediated pathways activation (19). In this work, we were interested in measuring these key-chemokines gene expression in chronically HCV-infected livers. *CXCL10* was highly induced in both HCV-infected biopsies (median of 297) and purified hepatocytes (median of 314) whereas it was not in normal biopsies (median of 18) and isolated hepatocytes (median of 10) (Fig. 2A). However, while similar results were obtained with *CXCL9* and *CXCL11* in HCV-infected biopsies compared to normal biopsies, results obtained with isolated HCV-infected hepatocytes were less pronounced (Fig. 2B and C). Strikingly, HCV-infected hepatocytes contribution to *CCL5*



mRNA expression in the whole liver biopsies was markedly weak with a median of 0.5 compared to a median of 7 obtained in HCV-infected liver biopsies (Fig. 2 D). This is in sharp contrast to what we observed with *CXCL10* and ISGs, suggesting that a non-hepatocyte cellular source (e.g. circulating PBMCs) could be responsible for this observed upregulation of specific antiviral genes such as *CCL5* in liver biopsies.

It is interesting to note that interferon-inducible chemokines *CXCL9*, *CXCL10* and *CXCL11* are induced in both HCV-infected biopsies and purified hepatocytes whereas interferon-independent *CCL5* expression is not supported by purified hepatocytes. This could suggest a differential interfering process targeting the early antiviral signaling cascade in hepatocytes but not the classical interferon pathway.

### **Specific antiviral Type I and III Interferons are not induced in chronically HCV-infected liver biopsies and corresponding isolated human hepatocytes**

*IFN $\beta$*  and *IFN $\lambda_{1,2,3}$*  production is a signature of CARDIF-mediated antiviral response since these antiviral effectors are highly induced (more than 100-fold) after intracellular dsRNA challenge in normal human primary hepatocytes (19). Hence, we wanted to determine if hepatocytes from chronically HCV-infected patients could produce IFN since we obtained high expression levels of ISGs in these cells. Interestingly, we were not able to detect any mRNA coding for type I interferon (*IFN $\alpha$*  and  *$\beta$* ) in chronically HCV-infected biopsies and purified hepatocytes (data not shown). *IFN $\lambda_2$*  was weakly but significantly induced in HCV-infected biopsies and hepatocytes with medians of 0.41 and 0.63 ( $p \leq 0.0001$ ) when compared to normal biopsies and purified hepatocytes with medians of 0.16 and 0.03 (Fig. 3). However, the total amount of transcript for this highly inducible gene in a context of a viral infection is paradoxically low compared to the other ISGs mRNAs expression levels we quantified (Fig. 3).

In this first part of the study, we clearly confirmed the induction of a strong ongoing antiviral response in chronically HCV-infected liver biopsies. Key ISGs and chemokines mRNAs are highly induced in chronically HCV-infected biopsies compared to normal biopsies and the hepatocytes contribution for this antiviral response is major in particular for ISGs such as *ISG15*, *IFIT1*, *OASL*, *DDX58* and *CXCL10*. Surprisingly, *IFN $\beta$*  and *IFN $\lambda$ 2* – key markers of CARDIF-mediated signaling pathway activation- were nearly undetectable in the context of a chronic HCV infection, and hepatocytes contribution to IFN-independent *CCL5* is almost inexistent.

### **CARDIF expression is significantly decreased in purified hepatocytes from chronically HCV-infected patients**

The fact that key antiviral genes (e.g., *ISG15*, *OASL*, *CCL5*) are differentially expressed in hepatocytes strongly argue for an interfering process targeting the early phase of antiviral signaling pathways but not the classical interferon pathway in the context of a global activated antiviral response in the chronically HCV-infected liver. CARDIF cleavage by HCV NS3/4A has largely been reported *in vitro* and *in vivo* as one of the major interfering strategy by HCV to counteract innate immune system activation. We have previously demonstrated that ectopically expressed NS3/4A in primary human hepatocytes actively interferes with intracellular dsRNA-mediated pathway by cleaving CARDIF. Liver biopsy samples and corresponding isolated hepatocytes from normal and chronically HCV-infected patients were analyzed by western blot using anti-NS3 and anti-CARDIF antibodies. As shown in Fig. 4A, NS3 protease was clearly detected in cell extract from one HCV-infected liver biopsy (lane 5) and weakly detected for the other two HCV-infected samples (lanes 3 and 4). After enrichment of purified hepatocytes, we detected significantly higher levels of NS3 suggesting that the viral protease is highly expressed in chronically HCV-infected hepatocytes (Fig. 4B, lanes 3, 4 and 5). This signal is specific since no signal was obtained in normal samples.

To address whether CARDIF is a target of NS3 protease activity in chronically HCV-infected biopsies and isolated hepatocytes, we analyzed CARDIF cleavage by western blotting. We observed a global decrease of the total amount of native CARDIF in all tested chronically HCV-infected hepatocytes (Fig. 4B and supplemental Fig. 1). It is noteworthy that CARDIF cleavage product was clearly detected in the sample with the higher expression level of NS3 (Fig. 4 top panels, HCV 5). Cell extracts from the NS3/4A expressing hepatocytes served as positive control and reference for CARDIF proteolysis levels. Low levels of NS3/4A in chronically HCV-infected material when compared to positive control could explain low levels of CARDIF cleavage (Fig. 4 A and B, lines 3 and 4).

Globally these results show a significant decrease in the level of native CARDIF concomitant to NS3/4A expression suggesting an interfering viral strategy at this level of the antiviral signaling cascade in hepatocytes from chronically HCV-infected patients.

### **ISGs expression levels negatively correlate with HCV RNA in chronically HCV-infected biopsies and corresponding purified hepatocytes**

Since CARDIF cleavage seems to correlate with the amount of NS3, we investigated whether a correlation exists between HCV RNA levels and ISGs and chemokines genes expression. HCV RNA copy numbers were quantified in HCV-infected liver biopsies and purified HCV-infected hepatocytes by quantitative RT-PCR. We found a significant inverse correlation between *ISG15* and *IFIT1* mRNA and HCV viral RNA levels in both biopsies (Spearman  $r$  of -0.5228 and -0.5719 respectively;  $p$  values of 0.0216 and 0.0105) and purified hepatocytes (Spearman  $r$  of -0.5143 and -0.5786 respectively;  $p$  values of 0.0498 and 0.0238) (Fig. 5). *OASL* and *CCL5* mRNA levels also inversely correlate with HCV viral RNA with Spearman  $r$  of -0.4982 and -0.6316 and  $p$  values of 0.0299 and 0.0037 respectively, albeit only in HCV-infected biopsies (Fig. 5). It is interesting to note that strong correlation coefficient was obtained for *CCL5* which was poorly induced in purified

HCV-infected hepatocytes, underlying a potential interfering mechanism. According to Fig. 2, CCL5 was not detected in hepatocytes hence no correlation was calculated. No significant correlation was obtained for *CXCL9*, *10* and *11*.

In addition to a more extensive cleavage of CARDIF in hepatocytes from chronically HCV-infected patients where high level of NS3/4A was detected, we also showed an inverse correlation between upregulated ISGs expression and HCV RNA in hepatocytes, hence underlying HCV differential interfering strategies with the host innate immune response.

## Discussion

Despite recent advances with the discovery of the infectious clone JFH1 in the field of HCV research, knowledge about virus-host interactions is still limited since the large majority of experiments are conducted *in vitro* in hepatic cancer cell lines that lack key innate immune defense systems. In the context of a chronic HCV infection, very little is known about the status of the PRRs-mediated signaling pathways in human hepatocytes as well as the impact of the interfering viral strategies by HCV.

A significant ISGs upregulation has been demonstrated in liver biopsies from chronically HCV-infected patients and chimpanzees experimenting HCV infection, but these data are still enigmatic since the origin of this antiviral response and how the virus persists in this hostile environment remains unknown. The aim of this study was to further characterize previous demonstrations of the upregulation of ISGs mRNAs in chronically HCV-infected liver biopsies but also to investigate their exact cellular sources in order to unravel new interactions between HCV and its main target, the hepatocyte. In this work, we used chronically HCV-infected human liver biopsies obtained from HCV-infected patients undergoing liver transplantation as well as corresponding isolated hepatocytes for each biopsy. We had previously characterized functionality of antiviral sensing and signaling pathways in freshly isolated normal human hepatocytes and further demonstrated the upregulation of key ISGs such as *ISG15*, *IFIT1*, *OASL* and *DDX58* following both extracellular and intracellular dsRNA-activated pathways using quantitative PCR and microarray assays (19). We confirmed by quantitative RT-PCR that key ISGs mRNAs are highly and significantly induced in both biopsies and primary HCV-infected hepatocytes when compared to normal material. The fact that medians obtained for chronically HCV-infected purified hepatocytes were higher than in total biopsies supports a role for hepatocytes that largely contributes to this observed antiviral response. As a consequence, our results provide strong evidence for the existence of a sustained activation of the innate immune system in hepatocytes from chronically HCV-infected patients. We can hypothesize that this ISGs induction either originates from the activation of the early-immediate

phase of the antiviral pathway mediated by TRIF and CARDIF independently of any protein synthesis, or as a result of the activation of Jak-STAT pathway through autocrine or paracrine IFN synthesis. Interestingly, Pfeffer LM et al. were able to detect basal serum levels of IFN in 43% of chronically HCV-infected patients, which suggests that some of HCV infected patients are able to trigger an initial phase of the host innate immune response leading to a type I IFN production consistent with the intrahepatic ISGs upregulation we have described (33). Moreover, experiments using paired liver biopsies and PBMCs collected from HCV-infected patients demonstrated upregulated ISGs - but not IFN genes- in liver biopsies (31, 38), in sharp contrast to induction of both ISGs and various type I interferon subtypes in circulating PBMCs from these same patients. As a consequence, the source of interferon remains to be determined but could originate from infiltrated immune cells or from newly-infected hepatocytes where viral interfering strategies have not been established yet. Importantly, no type I interferon and very low levels of type III interferon genes were detectable in chronically HCV-infected material. We believe that minimal type I or type III interferon from an uncharacterized origin is responsible for this ISGs upregulation in chronically HCV-infected biopsies.

Andersen J., et al. made an interesting distinction between (1) IRF3-dependent response genes whose expression increase strictly relies on IRF3 recruitment to the promoter (e.g. *IFN $\beta$* , *IFN- $\alpha$ 4* or *IFN- $\alpha$ 5* genes), (2) IRF3-augmented genes whose induction is upregulated by IRF3 such as *CCL5*, which can also be independently induced by activated NF $\kappa$ B - but not by IFN - or (3) IRF3-independent genes such as *ISG15*, which can be independently activated by secreted interferon (1, 12-14). As a consequence, *IFN $\beta$*  and *CCL5* expression strictly depends on main transcriptional activators IRF3 and/or NF $\kappa$ B activation occurring at the early phase of antiviral cascade mediated by CARDIF recruitment. In contrast, *IFIT1*, *DDX58*, *ISG15* and *OASL* can be induced in an IRF3-independent manner through the classical IFN pathway in a CARDIF-independent manner.

In parallel, among early genes produced in response to dsRNA exposition in human primary hepatocytes, we had also identified *CXCL9*, *CXCL10* and *CXCL11* as highly induced genes after

dsRNA challenges in primary hepatocytes. These chemokines are responsible for recruitment of neutrophils, monocytes or lymphocytes to the infection site. These genes are highly inducible by interferons and are considered as IRF3-independent genes since classical IFN pathway activation is sufficient to induce their transcription (1). Interestingly, we observed high level of *CXCL10* mRNA expression levels in both HCV-infected biopsies and purified hepatocytes. In the case of *CXCL9* and *CXCL11*, we found that immune infiltrates are probably a partial source of these chemokines in an HCV-infected liver since hepatocytes only partially participate in their expression. Globally, liver gene expression studies and our work clearly demonstrate that the most significant changes in gene expression in the context of chronic HCV infection are the result of the transcriptional network regulated by IFNs, suggesting an ongoing response to endogenous IFN. This weak amount of type I interferon which was under our detection level, could originate from non-infected hepatocytes, from resident immune cells or infiltrating cells, and triggers the classical Jak-STAT pathway generating this observed activated state of an antiviral response. The fact that type I and III interferons as well as *CCL5* were poorly induced in HCV-infected hepatocytes suggests a specific interfering process targeting IRF3 and NF $\kappa$ B activation, but not the classical IFN pathway.

In contrast to Bellecave et al., who detected CARDIF cleavage in 48% of HCV-infected patients, we rather observed a global decrease in CARDIF total amount in every tested hepatocyte preparation from HCV-infected biopsies as compared to normal. Hasahina Y et al also reported the absence of CARDIF cleavage in HCV-infected liver biopsies but observed a total CARDIF amount downregulation, probably because the cleaved product is unstable *in vivo*, resulting in rapid degradation. Interestingly, we obtained significant negative correlations between *ISG15*, *OASL* and *IFIT1* mRNAs and viral RNA, which also confirms the existence of an interfering process mediated by the virus.

The differential antiviral genes upregulation and the absence of interferon detection concomitant with CARDIF diminution in HCV-infected material cleavage as well as our negative correlations between ISGs mRNAs and viral RNA underlie an active viral-derived strategy to impair the

antiviral response in chronically HCV-infected hepatocytes. Our observations clearly suggest that in the context of a chronic HCV infection, NS3/4A still interferes, at least partially, with dsRNA detection pathway despite the intriguing induced battery of ISGs observed in both HCV-infected biopsies and purified hepatocytes. The fact that HCV is still able to establish a chronic infection in this hostile environment, strongly suggest that either essential antiviral genes are interfered during the early phase of the antiviral signaling pathway and are not induced by interferons, or that expression of ISGs is benefic – to some extent- for the virus persistence. Recent findings suggest that non-responders have an upregulated and largely ineffective IFN response, which is associated to little benefit from PEG-IFN based anti-HCV treatment (2, 3, 9, 23). In sharp contrast, responders to therapy more closely resembled healthy controls in term of baseline levels of ISGs mRNA. The findings in non-responders support the interesting concept that activation of the endogenous IFN system in chronically HCV-infected patients not only is ineffective in spontaneously clearing the infection, but may also impede the response to therapy. An effective anti-HCV treatment targeting early steps in viral strategies aimed at interfering with host innate immune response should disturb this intriguing viral-controlled upregulation of ISGs and could finally lead to viral eradication.

## **Acknowledgments**

We thank Martin Baril for his scientific comments and for reviewing the manuscript. We thank Didier Trono (University of Geneva) for the lentiviral-based expression vectors (pWPI, psPAX2 and pMD2G) and Virochem Pharma Inc for providing HCV protease inhibitor BILN2061.



## Figures legends

### **Figure 1: Analysis of selected ISGs mRNAs expression levels in normal and chronically HCV-infected human liver biopsies and corresponding isolated hepatocytes**

Real-time PCR analysis of *ISG15* (A), *OASL* (B), *IFIT1* (C) and *DDX58* (D) were performed on different liver biopsy samples from normal (n=11) and chronically HCV-infected patients (n=16) and corresponding purified hepatocytes as described in Material and Methods. Values along the y-axis represent the ratio, in arbitrary units of a given gene versus the same correcting factor for the four genes. This factor was calculated as the mean of two stable normalizing hepatic genes. The medians obtained for each paired groups (HCV-infected biopsies versus normal biopsies, HCV-infected hepatocytes versus normal hepatocytes) were compared. The *p* values were obtained with the Mann-Whitney test and were significant when  $\leq 0.05$ . The median is represented by a plain bar for each group.

### **Figure 2: Differential expression of *CXCL9*, *10*, *11* and *CCL5* genes in normal and chronically HCV-infected liver biopsies and corresponding isolated hepatocytes**

Real-time PCR analysis of *CXCL10* (A), *CXCL9* (B), *CXCL11* (C) and *CCL5* (D) were performed on different liver biopsy samples from normal (n=11) and chronically HCV-infected patients (n=16) and corresponding purified hepatocytes as described in Material and Methods. Values along the y-axis represent the ratio, in arbitrary units of a given gene versus the same correcting factor for the four genes. This factor was calculated as the mean of two stable hepatic genes. The medians obtained for each paired groups (HCV-infected biopsies versus normal biopsies, HCV-infected hepatocytes versus normal hepatocytes) were compared. The *p* values were obtained with the Mann-Whitney test and were significant when  $\leq 0.05$ . The median is represented by a plain bar for each group.

**Figure 3: *IFN $\lambda$ 2* weak expression in normal and chronically HCV-infected biopsies and corresponding isolated hepatocytes**

Real-time PCR analysis of *IFN $\lambda$ 2* was performed on different liver biopsy samples from normal (n=11) and chronically HCV-infected patients (n=16) and corresponding purified hepatocytes as described in Material and Methods. Values along the y-axis represent the ratio, in arbitrary units of a given gene versus the same correcting factor for the four genes. This factor was calculated as the mean of two stable hepatic genes. The medians obtained for each paired groups (HCV-infected biopsies versus normal biopsies, HCV-infected hepatocytes versus normal hepatocytes) were compared. The *p* values were obtained with the Mann-Whitney test and were significant when  $\leq 0.05$ . The median is represented by a plain bar for each group.

**Figure 4: HCV NS3/4A protease expression and concomitant CARDIF decrease in purified hepatocytes from chronically HCV-infected patients**

Total proteins from normal and chronically HCV-infected human liver biopsies (A) and corresponding purified hepatocytes (B) were analyzed by immunoblotting using anti-NS3 and anti-CARDIF antibodies. Anti- $\beta$ -actin and anti-hepatocyte antibodies were used as controls for the amount of protein loaded per lane. NS3/4A and empty vector-expressing hepatocytes (lines NS3 and pWPI) served as controls for NS3 and native and cleaved CARDIF.

**Figure 5: Correlation of HCV viral load with ISGs mRNA expression in liver biopsies and corresponding hepatocytes from chronically HCV-infected patients**

Real-time PCR analysis of biopsies (n=19) and corresponding purified hepatocytes (n=15) from chronically HCV-infected patients were determined for ISG15 (A and B), ISG56 (C and D), OASL (E) and CCL5 (F) and correlated with HCV RNA. Values along the x and y-axis represent the ratio, in arbitrary units of a given gene versus the same correcting factor for all genes. This factor was

calculated as the mean of two stable hepatic genes. The Spearman  $r$  and  $p$  values were obtained using correlation test of GraphPad PRISM Version 3.02.

## References

1. Andersen J, VanScoy S, Cheng TF, Gomez D, Reich NC. IRF-3-dependent and augmented target genes during viral infection. *Genes Immun* 2008 Mar;9(2):168-175.
2. Asahina Y, Izumi N, Uchihara M, Noguchi O, Nishimura Y, Inoue K, et al. Interferon-stimulated gene expression and hepatitis C viral dynamics during different interferon regimens. *J Hepatol* 2003 Sep;39(3):421-427.
3. Asselah T, Bieche I, Sabbagh A, Bedossa P, Moreau R, Valla D, et al. Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut* 2009 Jun;58(6):846-858.
4. Baril M, Racine ME, Penin F, Lamarre D. MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of HCV NS3/4A protease. *J Virol* 2008 Nov 26.
5. Bellecave P, Sarasin-Filipowicz M, Donze O, Kennel A, Gouttenoire J, Meylan E, et al. Cleavage of mitochondrial antiviral signaling protein in the liver of patients with chronic hepatitis C correlates with a reduced activation of the endogenous interferon system. *Hepatology* 2009 Nov 13.
6. Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001 Aug;75(15):7059-7066.
7. Bigger CB, Guerra B, Brasky KM, Hubbard G, Beard MR, Luxon BA, et al. Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees. *J Virol* 2004 Dec;78(24):13779-13792.
8. Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, Akira S, Yoneyama M, et al. Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *J Virol* 2005 Apr;79(7):3969-3978.
9. Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis LL, Coltescu C, et al. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* 2005 May;128(5):1437-1444.
10. Cheng G, Zhong J, Chisari FV. Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 May 30;103(22):8499-8504.
11. Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA, Kelliher MA. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem* 2005 Nov 4;280(44):36560-36566.
12. Daly C, Reich NC. Characterization of specific DNA-binding factors activated by double-stranded RNA as positive regulators of interferon alpha/beta-stimulated genes. *J Biol Chem* 1995 Oct 6;270(40):23739-23746.
13. Genin P, Algarte M, Roof P, Lin R, Hiscott J. Regulation of RANTES chemokine gene expression requires cooperativity between NF-kappa B and IFN-regulatory factor transcription factors. *J Immunol* 2000 May 15;164(10):5352-5361.
14. Grandvaux N, Servant MJ, Tenover B, Sen GC, Balachandran S, Barber GN, et al. Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* 2002 Jun;76(11):5532-5539.
15. He XS, Rehermann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 May 11;96(10):5692-5697.
16. Helbig KJ, Lau DT, Semendric L, Harley HA, Beard MR. Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology* 2005 Sep;42(3):702-710.

17. Horner SM, Gale M, Jr. Intracellular innate immune cascades and interferon defenses that control hepatitis C virus. *J Interferon Cytokine Res* 2009 Sep;29(9):489-498.
18. Jiang Z, Zamanian-Daryoush M, Nie H, Silva AM, Williams BR, Li X. Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem* 2003 May 9;278(19):16713-16719.
19. Jouan L, Melancon P, Rodrigue-Gervais IG, Raymond VA, Selliah S, Boucher G, et al. Distinct antiviral signaling pathways in primary human hepatocytes and their differential disruption by HCV NS3 protease. *J Hepatol* 2009 Nov 27.
20. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005 Oct;6(10):981-988.
21. Lanford RE, Guerra B, Lee H, Chavez D, Brasky KM, Bigger CB. Genomic response to interferon-alpha in chimpanzees: implications of rapid downregulation for hepatitis C kinetics. *Hepatology* 2006 May;43(5):961-972.
22. Lau DT, Fish PM, Sinha M, Owen DM, Lemon SM, Gale M, Jr. Interferon regulatory factor-3 activation, hepatic interferon-stimulated gene expression, and immune cell infiltration in hepatitis C virus patients. *Hepatology* 2008 Mar;47(3):799-809.
23. Lempicki RA, Polis MA, Yang J, McLaughlin M, Koratich C, Huang DW, et al. Gene expression profiles in hepatitis C virus (HCV) and HIV coinfection: class prediction analyses before treatment predict the outcome of anti-HCV therapy among HIV-coinfected persons. *J Infect Dis* 2006 Apr 15;193(8):1172-1177.
24. Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, et al. 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* 2005 Feb 22;102(8):2992-2997.
25. Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Dec 6;102(49):17717-17722.
26. Lin R, Lacoste J, Nakhaei P, Sun Q, Yang L, Paz S, et al. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J Virol* 2006 Jun;80(12):6072-6083.
27. Loo YM, Owen DM, Li K, Erickson AK, Johnson CL, Fish PM, et al. Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Apr 11;103(15):6001-6006.
28. Matsui K, Kumagai Y, Kato H, Sato S, Kawagoe T, Uematsu S, et al. Cutting edge: Role of TANK-binding kinase 1 and inducible IkappaB kinase in IFN responses against viruses in innate immune cells. *J Immunol* 2006 Nov 1;177(9):5785-5789.
29. Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004 May;5(5):503-507.
30. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005 Oct 20;437(7062):1167-1172.
31. Mihm S, Frese M, Meier V, Wietzke-Braun P, Scharf JG, Bartenschlager R, et al. Interferon type I gene expression in chronic hepatitis C. *Lab Invest* 2004 Sep;84(9):1148-1159.
32. Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006 Jan 12;439(7073):208-211.

33. Pfeffer LM, Madey MA, Riely CA, Fleckenstein JF. The induction of type I interferon production in hepatitis C-infected patients. *J Interferon Cytokine Res* 2009 May;29(5):299-306.
34. Raymond VA, Selliah S, Ethier C, Houle R, Jouan L, Maniere T, et al. Primary cultures of human hepatocytes isolated from hepatitis C virus-infected cirrhotic livers as a model to study hepatitis C infection. *Liver Int* 2009 Mar 3.
35. Rodrigue-Gervais IG, Jouan L, Beaulieu G, Sauve D, Bruneau J, Willems B, et al. Poly(I:C) and lipopolysaccharide innate sensing functions of circulating human myeloid dendritic cells are affected in vivo in hepatitis C virus-infected patients. *J Virol* 2007 Jun;81(11):5537-5546.
36. Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G, et al. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* 2006 Jul 26;25(14):3257-3263.
37. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M, Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 2008 Jul 24;454(7203):523-527.
38. Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, Christen V, Terracciano L, Filipowicz W, et al. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 May 13;105(19):7034-7039.
39. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2003 Oct 15;171(8):4304-4310.
40. Sharma S, Tenover BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003 May 16;300(5622):1148-1151.
41. Smith MW, Yue ZN, Korth MJ, Do HA, Boix L, Fausto N, et al. Hepatitis C virus and liver disease: global transcriptional profiling and identification of potential markers. *Hepatology* 2003 Dec;38(6):1458-1467.
42. Soriano V, Peters MG, Zeuzem S. New therapies for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2009 Feb 1;48(3):313-320.
43. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 26;99(24):15669-15674.
44. Takahashi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, et al. Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* 2008 Feb 29;29(4):428-440.
45. Vilasco M, Larrea E, Vitour D, Dabo S, Breiman A, Regnault B, et al. The protein kinase IKKepsilon can inhibit HCV expression independently of IFN and its own expression is downregulated in HCV-infected livers. *Hepatology* 2006 Dec;44(6):1635-1647.
46. Walters KA, Joyce MA, Thompson JC, Smith MW, Yeh MM, Proll S, et al. Host-specific response to HCV infection in the chimeric SCID-beige/Alb-uPA mouse model: role of the innate antiviral immune response. *PLoS Pathog* 2006 Jun;2(6):e59.
47. Wang N, Liang Y, Devaraj S, Wang J, Lemon SM, Li K. Toll-like receptor 3 mediates establishment of an antiviral state against hepatitis C virus in hepatoma cells. *J Virol* 2009 Oct;83(19):9824-9834.
48. Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J, et al. The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nat Immunol* 2007 Jun;8(6):592-600.

**Table 1:** Demographic features of chronically HCV-infected patients

Livers ID	date	Age (years)	Gender	Genotype	Prior treatment
<b>HCV 1</b>	07/11/2003	<b>61</b>	<b>M</b>	<b>4-A</b>	<b>Y</b>
<b>HCV 2</b>	04/06/2004	<b>53</b>	<b>M</b>	<b>1-B</b>	<b>N</b>
<b>HCV 3</b>	24/08/2004	<b>54</b>	<b>M</b>	<b>1</b>	<b>N</b>
<b>HCV 4</b>	13/11/2004	<b>50</b>	<b>M</b>	<b>1-A</b>	<b>Y</b>
<b>HCV 5</b>	08/12/2004	<b>51</b>	<b>F</b>	<b>1a</b>	<b>Y</b>
<b>HCV 6</b>	22/04/2005	<b>51</b>	<b>M</b>	<b>1-B</b>	<b>Y</b>
<b>HCV 7</b>	19/08/2005	<b>51</b>	<b>M</b>	<b>2-B</b>	<b>N</b>
<b>HCV 8</b>	24/01/2006	<b>59</b>	<b>M</b>	<b>1-B</b>	<b>Y</b>
<b>HCV 9</b>	07/02/2006	<b>67</b>	<b>M</b>	<b>2</b>	<b>Y</b>
<b>HCV 10</b>	16/02/2006	<b>48</b>	<b>M</b>	<b>1-A</b>	<b>Y</b>
<b>HCV 11</b>	24/02/2006	<b>48</b>	<b>M</b>	<b>1-A</b>	<b>N</b>
<b>HCV 12</b>	18/05/2006	<b>63</b>	<b>M</b>	<b>1-B</b>	<b>Y</b>
<b>HCV 13</b>	23/05/2006	<b>43</b>	<b>M</b>	<b>3-A</b>	<b>N</b>
<b>HCV 14</b>	24/05/2006	<b>54</b>	<b>M</b>	<b>1-A</b>	<b>N</b>
<b>HCV 15</b>	12/06/2006	<b>55</b>	<b>M</b>	<b>3-A</b>	<b>Y</b>
<b>HCV 16</b>	16/10/2007	<b>67</b>	<b>F</b>	<b>1-B</b>	<b>Y</b>
<b>HCV 17</b>	02/07/2008	<b>50</b>	<b>M</b>	<b>1a</b>	<b>Y</b>
<b>HCV 18</b>	15/03/2008	<b>52</b>	<b>M</b>	<b>1</b>	<b>Y</b>

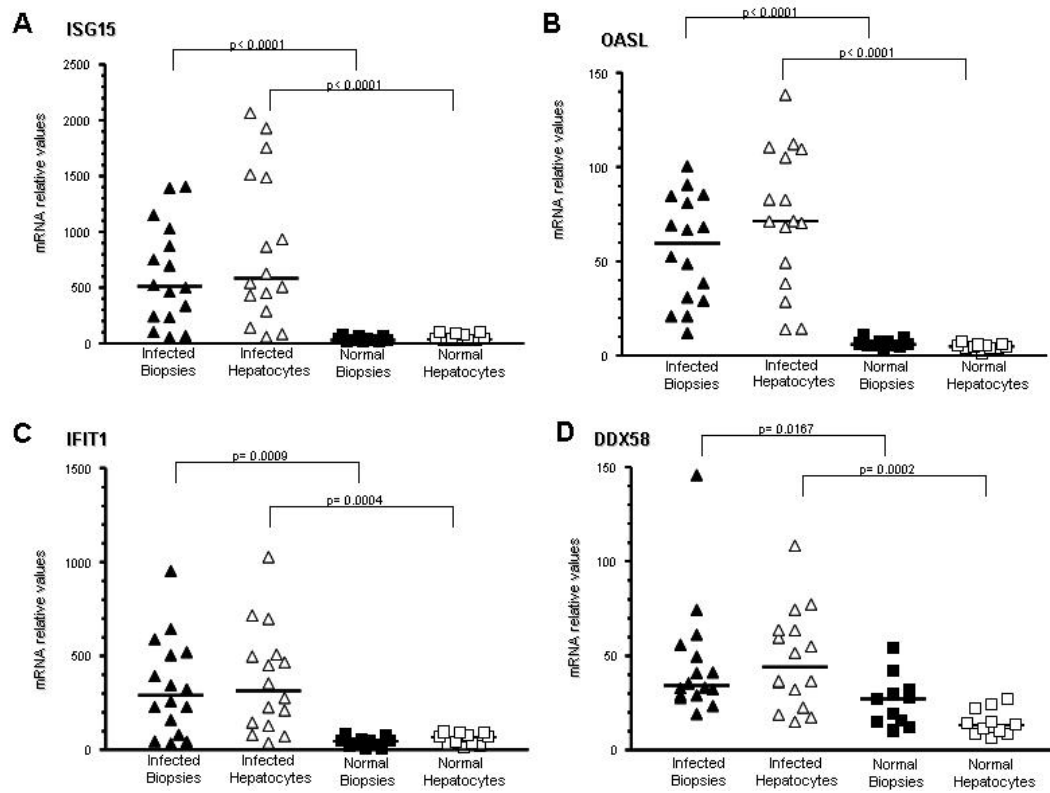
<sup>a</sup> Abbreviations: M, male; F, female

**Table 2:** Demographic features of non-infected patients

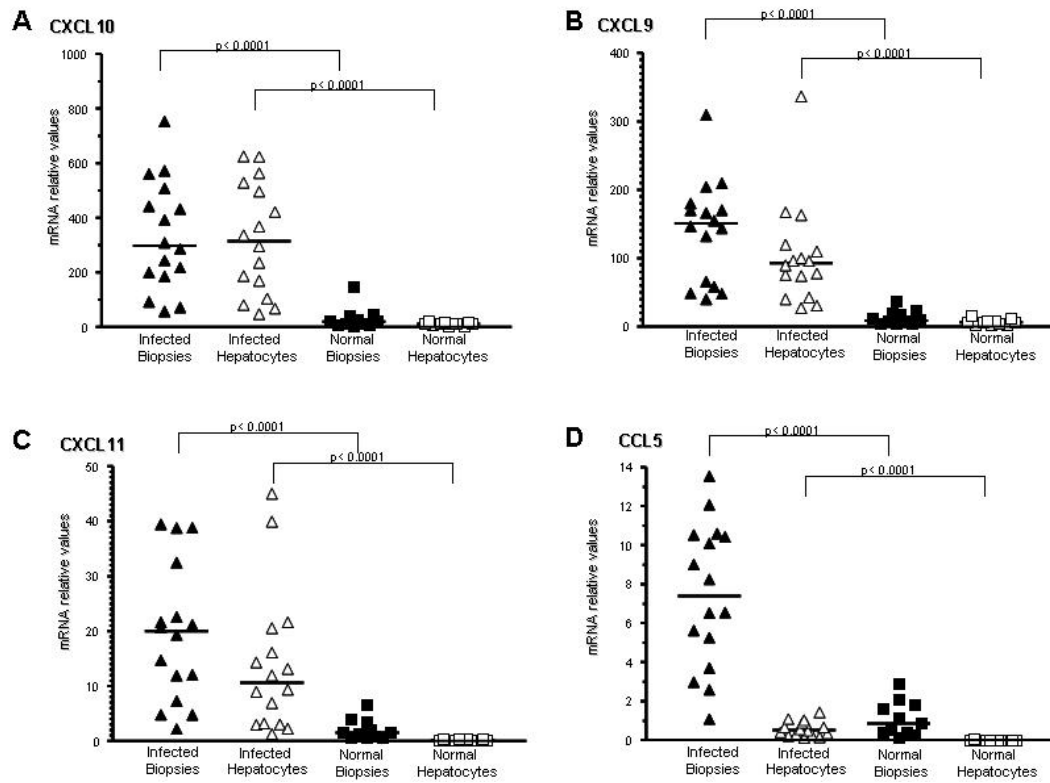
Livers ID	date	Age (years)	Gender
<b>HN A</b>	17/01/2006	<b>57</b>	<b>M</b>
<b>HN B</b>	07/02/2006	<b>73</b>	<b>M</b>
<b>HN C</b>	03/05/2006	<b>54</b>	<b>F</b>
<b>HN D</b>	18/05/2006	<b>77</b>	<b>M</b>
<b>HN E</b>	06/06/2006	<b>58</b>	<b>M</b>
<b>HN F</b>	24/08/2006	<b>66</b>	<b>M</b>
<b>HN G</b>	27/09/2006	<b>55</b>	<b>M</b>
<b>HN H</b>	21/06/2007	<b>76</b>	<b>F</b>
<b>HN I</b>	21/11/2007	<b>74</b>	<b>F</b>
<b>HN J</b>	15/01/2008	<b>66</b>	<b>F</b>
<b>HN K</b>	29/01/2008	<b>30</b>	<b>F</b>
<b>HN L</b>	12/02/2008	<b>68</b>	<b>F</b>
<b>HN M</b>	24/04/2008	<b>51</b>	<b>M</b>
<b>HN N</b>	24/08/2008	<b>64</b>	<b>F</b>



**Figure 1:** Analysis of selected ISGs mRNAs expression levels in normal and chronically HCV-infected human liver biopsies and corresponding isolated hepatocytes

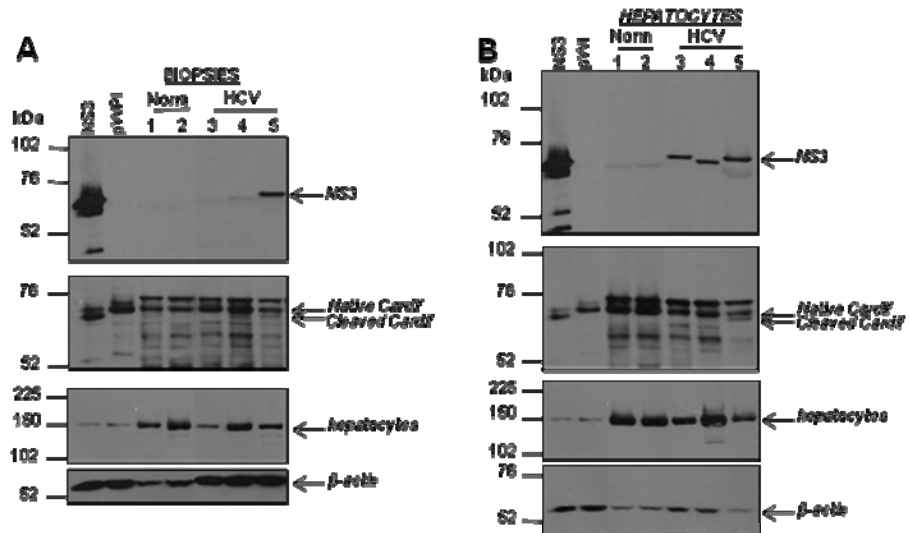


**Figure 2:** Differential expression of *CXCL9*, *10*, *11* and *CCL5* genes in normal and chronically HCV-infected liver biopsies and corresponding isolated hepatocytes

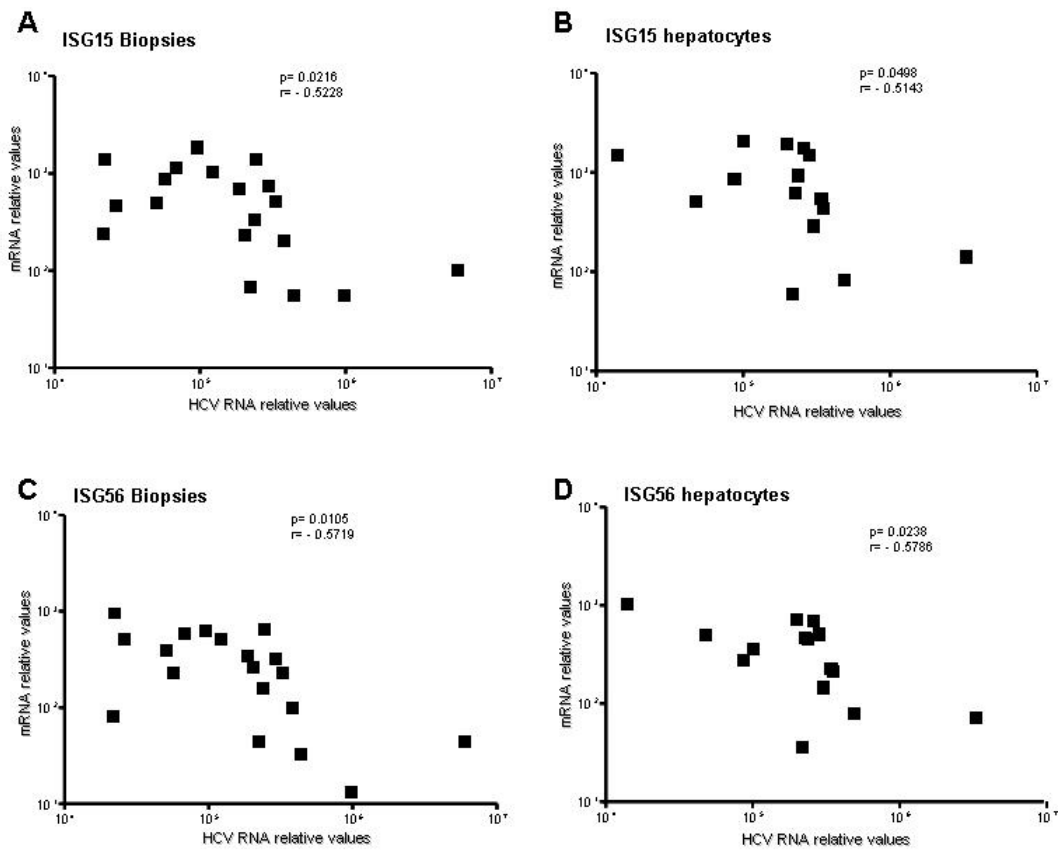


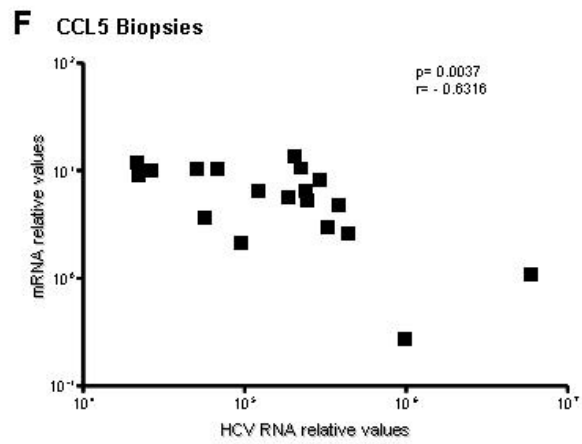
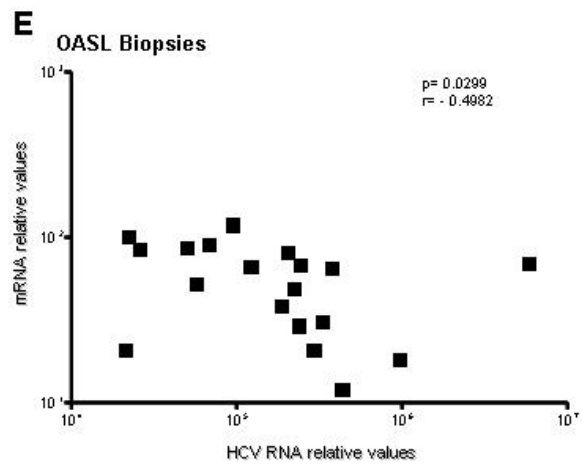


**Figure 4:** HCV NS3/4A protease expression and concomitant CARDIF decrease in purified hepatocytes from chronically HCV-infected patients



**Figure 5:** Correlation of HCV viral load with ISGs mRNA expression in liver biopsies and corresponding hepatocytes from chronically HCV-infected patients





**Supplemental table S1: Oligonucleotide sequences used for quantitative PCR**

Primers	Sequences (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Acquisition temperature (°C)
HMBS For	AAGCGGAGCCATGTCTGGTAAC	61	80
HMBS Rev	GTACCCACGCGAATCACTCTCA		
S9 For	CGTCTCGACCAAGAGCTGA	58	83
S9 Rev	GGTCCTTCTCATCAAGCGTC		
OASL For	GTGGAGGAGTTTCTGAGGCAG	58	83
OASL Rev	CCAGCTCCACCTCTCTGGTG		
IFN $\lambda$ 2 For	CTCAGGTTGCATGACTGGTG	60	82
IFN $\lambda$ 2 Rev	GAGGCCTCTGCACCTTCAAC		
IFN $\beta$ For	GAACCTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGC	65	79
IFN $\beta$ Rev	GTTCCCTTAGGATTTCCACTCTGACTATGGTCC		
ISG15 For	AGCGAACTCATCTTTGCCAGTACA	60	85
ISG15 Rev	CAGCTCTGACACCGACATGGA		
ISG56 FOR	GCCCAGACTTACCTGGACAA	60	79
ISG56 REV	GGTTTTTCAGGGTCCACTTCA		
CCL5 For	TACCATGAAGGTCTCCGC	60	84
CCL5 Rev	GACAAAGACGACTGCTGG		
CXCL9 For	GAGTGCAAGGAACCCAGTAGT	58	77
CXCL9 Rev	GGTGGATAGTCCCTTGGTTGGT		
CXCL10 For	TCCACGTGTTGAGATCATTGC	56	74
CXCL10 Rev	TCTTGATGGCCTTCGATTCTG		
CXCL11 For	CAAGGCTTCCCATGTTCA	58	74
CXCL11 Rev	CCCAGGGCCTATGCAAAGA		
RIG-1 For	GACTGGACGTGGCAAAACAA	56	75
RIG-1 Rev	TTGAATGCATCCAATATACACTTCTG		
HCV For	TCTGCGGAACCGGTGAGTA	60	72
HCV Rev	CAAGCACCTATCAGGCAGTA		

## **CHAPITRE 5 : Discussion**



L'infection avec le VHC est largement reconnue comme un problème de santé publique majeur dans la mesure où cette infection est responsable de la première cause de transplantation hépatique dans les pays développés et que l'inflammation chronique qu'elle engendre mène au développement d'une fibrose puis d'une cirrhose à l'origine d'hépatocarcinomes. Au cours de ce projet de doctorat nous avons voulu répondre à plusieurs questions essentielles à une meilleure compréhension de l'établissement de cette infection caractérisée par sa persistance chez plus de 50% des patients et pour lesquels un traitement basé sur de l'IFN pégylé couplé à la ribavirine reste insatisfaisant.

## **1. Caractérisation de la réponse antivirale dans des hépatocytes primaires humains**

Un des principaux freins dans le domaine de la recherche sur le VHC a longtemps reposé sur l'absence de modèle *in vitro* et *in vivo* permettant de reproduire l'infection telle que développée chez l'humain. Ainsi, les modèles mis en place pour l'étude du VHC qui existent actuellement, s'ils s'avèrent être très utiles pour étudier certains aspects de l'infection, n'en restent pas moins imparfaits, entre autre pour ce qui est des concepts de chronicité, d'inflammation chronique et de l'établissement de la fibrose du foie. Très récemment, le modèle du JFH1, un clone du VHC apte à produire un cycle de réplication *in vitro* complet a ouvert de nombreuses portes aux études s'intéressant au cycle viral dans des lignées hépatocytaires. Cependant, ces dernières ne possèdent pas de voie de signalisation antivirale intacte, et plusieurs autres défauts y ont été démontrés : prolifération anormale, dysfonctions mitochondriales, dérégulation de l'expression génique (absence de *caveolin-1* et 2) (Damm et al., 2005), protéine p53 mutée (Hsu et al., 1993) ou encore endocytose aberrante. De plus, une étude visant spécifiquement la caractérisation de la fonctionnalité des voies TLRs dans différentes lignées hépatocytaires a clairement démontré des défauts majeurs dans plusieurs de ces voies dont celle du TLR3, ce qui limite considérablement l'impact de ces études dont l'objectif reste pourtant de mieux définir les interactions virus-hôte (Preiss et al., 2008). Ainsi, l'absence de TLR3 dans les Huh7 ou encore la mutation au niveau de la protéine RIG-I (Sumpter et al., 2005) dans les Huh7.5 permettent certes de les rendre plus permissives au VHC, mais révèlent peu d'information concernant les mécanismes de subversion des cascades de signalisation antivirales. En considérant ces limitations, notre projet visant l'étude des voies de signalisation et des réponses antivirales dans des hépatocytes primaires fraîchement isolés est tout à fait innovateur, visant à la fois une meilleure définition de ce qu'est une réponse antivirale dans ce type cellulaire, mais aussi des multiples stratégies virales mises en place pour la contourner.

Dans un premier volet d'étude faisant partie de l'article 1 (chapitre 2), nous nous sommes intéressés au type de réponse engagée suite à l'exposition d'hépatocytes primaires humains mis en culture avec de l'ARNdb intracellulaire via les récepteur et adaptateur RIG-I/MDA5-CARDIF, et extracellulaire via TLR3-TRIF mimant ainsi les étapes précoces de la détection du virus par la cellule hôte. Nous avons pu établir clairement par PCR quantitatif et à l'échelle du transcriptome par microarrays, que ces voies sont à la fois fonctionnelles et distinctes, se traduisant par un profil d'expression génique spécifique pour chacune d'entre elles. En effet, si leur stimulation entraîne dans les deux cas l'induction de gènes antiviraux-clé comme des ISGs (*IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *OASL*), des chemokines (*CXCL9*, *10* et *11*) et des cytokines pro-inflammatoires (*IL6*), nous avons également démontré que la voie médiée par RIG-I/MDA5 a la particularité d'induire de hauts niveaux d'expression d'*IFN $\beta$*  (IFN de type I) et des *IFN $\lambda_{1,2,3}$*  (IFN de type III), ce qui n'est pas le cas de la voie médiée par le TLR3. Cette observation nous permet, de façon indirecte, d'affirmer que ces deux voies de signalisation sont bien distinctes, même si nous ne pouvons pas tout à fait exclure un recoupement partiel entre les deux voies. En effet, si nous pouvons exclure l'activation de RIG-I/MDA5 lorsque du poly(I:C) est ajouté dans le milieu puisque les niveaux d'IFNs de type I ou III sont négligeables après 6 hrs de stimulation, on pourrait envisager que la lipofectamine, utilisée comme vecteur pour le poly(I:C) afin de stimuler la voie RIG-I/MDA5, potentialise la voie du TLR3. Cela dit, l'effet drastique de la protéase NS3/4A sur la voie RIG-I/MDA5 associé au clivage de CARDIF en comparaison avec son faible effet sur la voie médiée par le poly(I:C) extracellulaire, nous indique toutefois, toujours de façon indirecte, que ces deux voies sont bien distinctes.

Une façon d'éclaircir ce point serait d'effectuer un marquage du poly(I:C) et de suivre la fluorescence par microscopie confocale. Les récepteurs RIG-I/MAD5 étant cytosoliques contrairement au TLR3 endosomal, des expériences de co-marquage nous permettraient de mieux définir l'association entre le poly(I:C) et son récepteur selon le mode d'administration, extra ou intracellulaire. Finalement, l'utilisation d'ARN à interférence dirigé contre les récepteurs et leurs adaptateurs, nous permettrait d'aborder la question d'un point de vue fonctionnel et d'établir une analyse plus fine des différents éléments des cascades de signalisation mis en jeu au cours de ces différentes stimulations.

L'induction de la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire par RIG-I/MDA5 aboutit à de hauts niveaux d'expression des IFNs de type I et III. Ces derniers, une fois sécrétés dans l'environnement, ont un impact majeur puisqu'ils permettent l'activation de la voie classique des IFNs à la fois par la cellule initialement productrice (voie autocrine) mais aussi par les cellules

environnantes (voie paracrine). La voie des IFNs est en effet une voie d'amplification du signal essentielle, permettant l'induction de nombreux gènes antiviraux comportant des ISREs (Interferon Stimulated Response Element) au niveau de leur promoteur, comme entre autres, les ISGs, mais aussi les récepteurs à ARNdb comme RIG-I et TLR3 ou le facteur de transcription IRF7 nécessaire à l'induction des IFN $\alpha$ , ce qui permet de réamplifier la cascade de signalisation, et ce, dès 6 hrs après la stimulation initiale. Il est particulièrement intéressant de constater que parmi les premiers gènes les plus induits au cours de la stimulation de la voie RIG-I/MDA-5 dans des hépatocytes primaires, nos études de microarrays nous ont permis d'identifier les IFNs de type III, dont l'IL-28B. Or, il a récemment été démontré qu'un polymorphisme unique au niveau d'un nucléotide (SNP pour Single Nucleotide Polymorphism) dans la séquence de l'IL-28B était très significativement associé à une réponse virologique soutenue suite au traitement IFN-PEG + ribavirine chez une cohorte de plus de 1600 patients atteints d'une infection chronique avec le VHC de génotype 1 (Ge et al., 2009). Deux autres études similaires ont rapporté des associations entre d'autres polymorphismes nucléotidiques toujours au niveau du locus de l'IL28B et une réponse antivirale soutenue suite au traitement IFN-PEG chez des patients chroniquement infectés avec le VHC (Suppiah et al., 2009; Tanaka et al., 2009).

Notre caractérisation fonctionnelle des voies de signalisation nous a également permis de mettre en évidence l'importance de la notion de cinétique au cours d'une réponse antivirale, en particulier lors d'une stimulation avec de l'ARNdb extracellulaire. En effet, certains gènes comme l'IFN $\beta$  sont induits au cours des trois premières heures suivant la stimulation, puis se retrouvent à leur niveau basal après six heures. Cet aspect de régulation transcriptionnelle est fondamental pour deux raisons. Tout d'abord, les IFNs étant de puissants effecteurs, une stimulation prolongée pourrait être néfaste pour l'organisme, entre autre parce que les IFNs de type I amplifient considérablement le signal initial et que leur impact sur les cellules environnantes est majeur. Cette notion de cinétique est aussi fondamentale dans la mesure où ce type de gènes à régulation stricte peut être une cible de choix pour les virus qui peuvent en les détournant, modifier tout une cascade de signalisation autrement très finement régulée. Comme nous le verrons plus loin, il est particulièrement intéressant de constater que dans des hépatocytes chroniquement infectés avec le VHC, la régulation de l'IFN $\beta$  est affectée dans le contexte d'une stimulation avec de l'ARNdb extracellulaire.

En se basant sur les profils d'expression génique spécifiques à l'activation de chacune de ces voies, il serait particulièrement intéressant de décortiquer davantage les voies de signalisation médiées par les récepteurs TLR3 et RIG-I/MDA5 impliqués dans la détection de l'ARNdb afin,

entre autre, d'approfondir cette notion de cinétique. En effet, l'IFN $\beta$  n'est pas soumis à une régulation transcriptionnelle négative rapide dans le contexte d'une stimulation de la voie médiée par RIG-I, alors que tous les facteurs de transcription y sont pourtant largement activés. Il est d'ailleurs intéressant de constater comment, à partir de facteurs de transcription activés communs, deux cascades de signalisation peuvent induire un profil d'expression si différent pour un gène donné. L'importance du réarrangement de la chromatine rendant accessible ou non certaines régions-clé du promoteur de l'IFN $\beta$  a déjà été souligné, avec, entre autre, l'acétylation de la protéine HMGA1 régulant l'efficacité de la transcription, ainsi que l'importance de son complexe transcriptionnel appelé « enhanceosome » (Ford et Thanos, 2010). Il existe donc des régulateurs positifs et négatifs importants dans la voie médiée par le TLR3 et qui pourraient d'ailleurs potentiellement être ciblés par le virus pour contrôler la réponse de l'hôte à son avantage.

Nous avons débuté une étude utilisant des ARN interférant (siRNA) afin de mieux définir le rôle des différents récepteurs antiviraux-clé comme RIG-I, TLR3, PKR et MDA5 ainsi que le rôle des adaptateurs TRIF et CARDIF et ce, avec différents types de ligands. Il serait intéressant de poursuivre cette caractérisation, afin d'avoir une meilleure compréhension de ces cascades de signalisation. De plus, nous avons abordé plus haut la possibilité d'un chevauchement entre les voies médiées par TLR3 et RIG-I. Cet aspect est intéressant dans la mesure où un chevauchement des voies impliquant des adaptateurs communs dans les cascades de signalisation permettrait au virus de bloquer plusieurs voies de signalisation en ne visant qu'un seul adaptateur. Il serait donc intéressant d'utiliser les outils de siRNA pour mieux définir ces voies de détection de l'ARNdb et leurs potentiels points de recoupement.

Ces mêmes études fonctionnelles pourraient être poursuivies avec deux modèles d'infection d'hépatocytes primaires humains avec le VHC que nous avons commencé à mettre en place dans le laboratoire. Le premier est basé sur l'exposition d'hépatocytes primaires à des sérums provenant de patients chroniquement infectés avec le VHC. Le second modèle repose sur une exposition des hépatocytes primaires au JFH-1. Si le premier modèle demande encore certaines mises au point, comme la sélection de sérums hautement infectieux, il a été très récemment démontré que ce type d'expérimentation pouvait fonctionner et donner lieu à une culture d'hépatocytes primaires infectés avec le VHC *in vitro* (Buck, 2008). Avec le clone JFH-1, nos résultats préliminaires se sont avérés très encourageants, puisque nous avons détecté de l'ARN viral après 72 hrs. En améliorant et confirmant ces deux modèles, il serait intéressant de dresser les profils d'expression génique des hépatocytes primaires humains en culture afin d'y caractériser la réponse au VHC. Une étude de siRNA ouvrirait les portes non seulement à une meilleure compréhension des voies antivirales

engagées par des hépatocytes exposés au VHC spécifiquement, mais aussi à proposer de nouveaux acteurs aux différentes cascades de signalisation, entre autres de potentiels régulateurs. De plus, une étude à l'échelle transcriptomique sur des cellules Huh7.5 infectées avec le JFH-1 a révélé une forte induction de plusieurs cytokines et ISGs en dépit de l'absence du TLR3 et de l'expression d'un RIG-I muté. Ceci suggère l'existence d'autres récepteurs au VHC, un aspect que l'on pourrait également aborder avec l'utilisation de shRNA. En effet, si nous visions une étude à grande échelle, nous pourrions utiliser une banque génomique de shRNA (48000 shRNA contre 16000 gènes humains) déjà accessible au laboratoire (collection « Mission<sup>®</sup> shRNA », Broad Institute, Sigma-Aldrich). Une étude menée dans le laboratoire utilisant une technique de criblage de shRNA a déjà permis d'identifier dans un modèle d'infection de cellules 293T avec le virus de Sendai, 253 régulateurs positifs et négatifs impliqués dans la voie de production d'IFN $\beta$  en réponse à une infection virale. Il serait intéressant de reproduire ce criblage dans le cadre d'une infection avec le VHC utilisant des hépatocytes primaires humains et le JFH-1, ou tout au moins de tester ces 253 régulateurs de l'immunité antivirale innée dans notre système d'hépatocytes primaires.

S'il est maintenant établi que l'ARN du VHC est reconnu par ses motifs triphosphates à l'extrémité 5' et par sa queue poly(U/UC) en 3' par le récepteur intracellulaire RIG-I, une réévaluation de la contribution du TLR3 à la détection du VHC dans des hépatocytes primaires est fondamentale. Cet aspect est une source de débat, tout comme l'est la notion du clivage de TRIF par NS3/4A, deux points qu'il serait intéressant de ré-aborder dans un système plus adéquat utilisant des niveaux de NS3/4A plus physiologiques, et des cellules dont la voie TLR3 est bien fonctionnelle, en l'occurrence, des hépatocytes primaires. En effet, nous n'avons pas observé de clivage ou de diminution de TRIF, ni d'interférence claire avec l'induction des gènes antiviraux-clé dans un système d'hépatocytes primaires exprimant NS3/4A de façon ectopique. Cela dit, nous avons démontré avec les travaux de Rodrigue-Gervais et al. dans les mDCs, le rôle de la voie de détection de l'ARNdb par le récepteur TLR3 au cours d'une infection chronique avec le VHC est loin d'être négligeable. En effet, ces résultats rapportent une évidence claire de l'association entre le VHC et la perte de fonction liée à la présence d'ARN viral dans les mDCs via une interférence avec la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire médiée par le TLR3, un point que nous n'avons pas observé dans des hépatocytes primaires humains exprimant la NS3/4A. Il serait donc d'un grand intérêt de remettre en perspective l'ARN du VHC comme ligand pour le TLR3 dans le contexte d'hépatocytes primaires, afin de mettre en lumière si cette cascade de signalisation engendre ou non une réponse antivirale dans le cadre de cette infection et si elle fait l'objet d'une stratégie de subversion par le VHC. Il est également possible que selon le type cellulaire concerné, le VHC soit

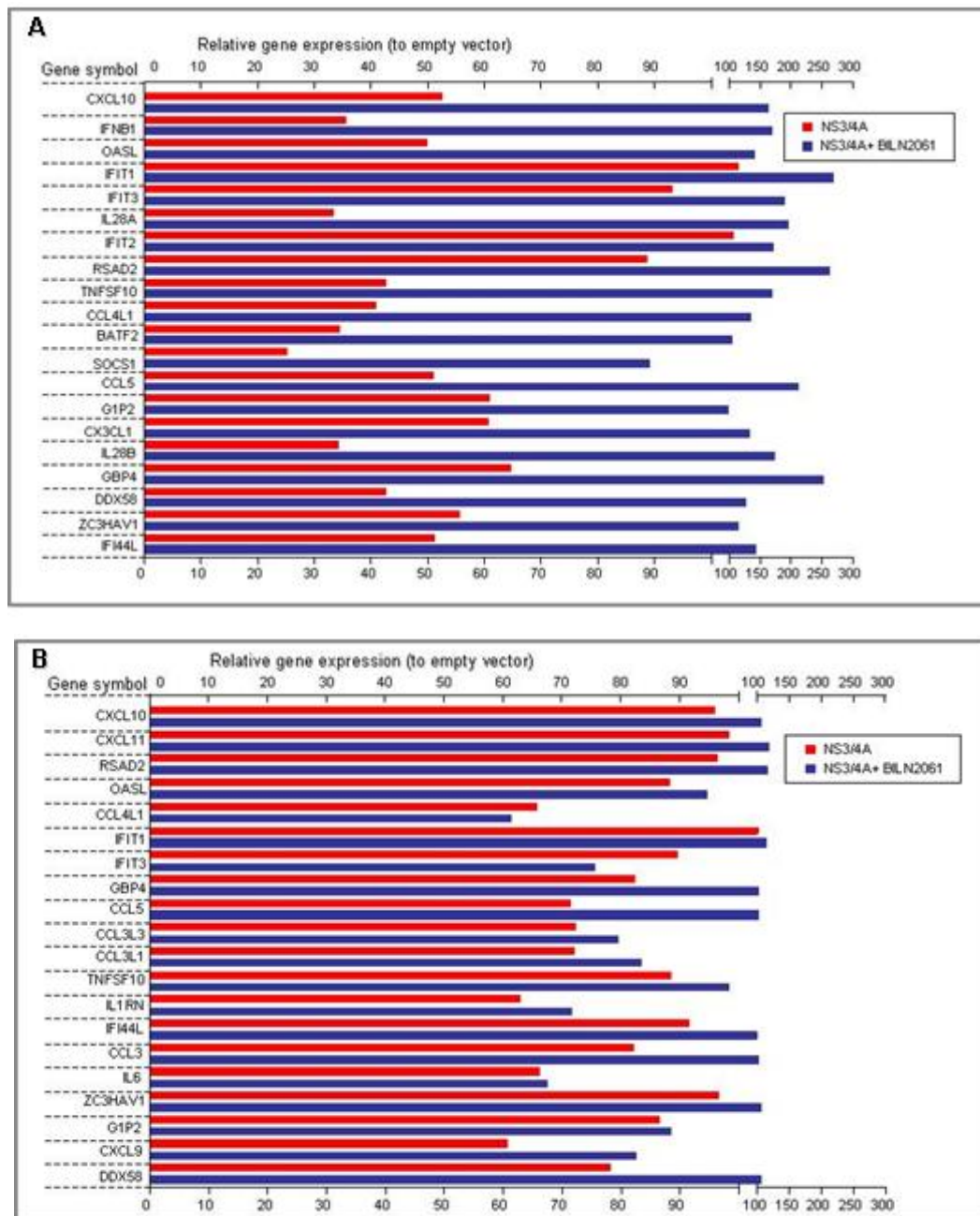
détecté différenciellement par RIG-I ou TLR3, une voie plutôt qu'une autre pouvant être privilégiée dans un type cellulaire donné.

## 2. Mécanismes de subversion des voies de l'immunité innée par NS3/4A

Dans la deuxième partie de l'article 1, nous nous sommes intéressés aux effets subversifs de NS3/4A sur les voies antivirales dans des préparations d'hépatocytes primaires. Il apparaît très clairement que suite à une stimulation de la voie de détection de l'ARNdb médiée par RIG-I, les gènes les plus fortement induits qui appartiennent aux catégories fonctionnelles associées à la réponse immunitaire, sont aussi les gènes avec lesquels la protéase virale interfère le plus, ce défaut étant entièrement réparé en présence d'un inhibiteur spécifique de la protéase NS3/4A. On peut comprendre que cette voie étant largement impliquée dans la détection du VHC, elle est également une cible majeure pour le virus de façon à limiter la défense de l'hôte. Cette observation est d'autant plus intéressante que, lorsque l'on se penche sur la voie médiée par l'ARNdb extracellulaire via TLR3, on s'aperçoit que les gènes les plus induits ne sont que très peu ou pas ciblés par la protéase virale. À la **Fig. 4** du **chapitre 2**, nous avons choisi de présenter les données obtenues par Microarrays de façon à mettre en évidence les gènes les plus interférés par ordre décroissant après stimulation des voies extracellulaire (**Fig. 4A, chapitre 2**) et intracellulaire (**Fig. 4B, chapitre 2**).

À la vue de ces résultats, nous avons également opté pour une présentation différente de ces mêmes données (voir ci-dessous, **Fig. 1A** et **1B**). Nous avons présenté cette fois-ci les 20 premiers gènes les plus induits pour chacune des deux voies de détection de l'ARNdb obtenus avec le vecteur lentiviral vide, puis nous leur avons associé à chacun leurs niveaux d'induction en présence de NS3/4A, avec ou sans BILN2061. Suite à cet exercice, nous pouvons constater que parmi les 20 premiers gènes les plus induits après stimulation de la voie intracellulaire, la majorité est clairement interférée par NS3/4A, puis rétablie en présence de BILN2061 (**Fig. 1A**). Par contre, les gènes les plus induits suite à la stimulation de la voie extracellulaire ne sont quasiment pas interférés en présence de NS3/4A (**Fig. 1B**). Ceci nous amène donc à conclure que la réponse antivirale à proprement dite induite par la cascade de signalisation du TLR3 n'est pas clairement ciblée par NS3/4A. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle, si la protéase NS3/4A n'affecte pas l'induction des gènes antiviraux suite à la stimulation de la voie TLR3-TRIF, c'est qu'il ne s'agit peut-être pas de la voie majeure de reconnaissance de l'ARN viral du VHC dans des hépatocytes primaires humains. Cependant, ceci n'exclut pas l'existence, à l'échelle du transcriptome humain, d'autres

fonctions de subversion que celle de la réponse immune innée au sens strict du terme par NS3/4A, et ce, dans le cadre de l'activation des deux voies de signalisation.



**Figure 1:** Expression relative des 20 premiers gènes induits suite à la stimulation des voies de détection de l'ARN intracellulaire (A) et extracellulaire (B) en présence de la protéine virale NS3/4A avec ou sans BILN2061

La stimulation des voies de détection de l'ARNdb intracellulaire et extracellulaire dans des hépatocytes primaires humains entraîne l'expression différentielle de 665 (A) et 852 (B) gènes en présence de la protéase NS3/4A (niveau d'induction  $\geq 2$  ou  $\leq -2$ ) respectivement. L'expression relative en présence de NS3/4A par rapport au vecteur lentiviral contrôle est présentée pour les 20 premiers gènes les plus induits par ordre décroissant après stimulation de chacune des voies (en rouge). Les niveaux obtenus en présence de BILN2061 sont également indiqués pour chacun de ces gènes (en bleu).

Au-delà de l'interférence avec les gènes antiviraux-clé, notre étude à l'échelle du transcriptome sur des hépatocytes exprimant la NS3/4A et soumis à des stimulations avec de l'ARN intra ou extracellulaire nous a permis d'aborder les voies de l'immunité innée et la persistance virale sous un angle tout à fait différent mais non moins intéressant. En effet, nous avons observé dans le contexte d'une stimulation de la voie RIG-I que des gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose se trouvaient inhibés en présence de NS3/4A. Nous avons également observé que dans le contexte d'une activation de la voie TLR3, un grand nombre de gènes codant pour des protéines-clé impliquées dans la régulation de l'apoptose sont significativement induits malgré la présence de NS3/4A. Par ailleurs, une étude particulièrement intéressante de microarrays fut menée afin de caractériser la réponse de l'hôte à l'infection avec le VHC en utilisant la chimère VHC-J6/JFH dans des cellules Huh7.5 (Walters et al., 2009). Malgré l'imperfection de ce modèle, entre autre l'absence du TLR3 et un RIG-I muté, l'ensemble de la polyprotéine virale y est toutefois exprimée à des niveaux plus physiologiques. Après 72 hrs d'infection, le clivage de la caspase-3 a été constaté ainsi que l'expression différentielle de nombreux gènes appartenant à des catégories fonctionnelles comme la mort cellulaire, la régulation du cycle cellulaire ainsi que les mécanismes reliés à la prolifération ou à la croissance cellulaire. De plus, il a été démontré que les patients chroniquement infectés avec le VHC présentaient de plus hauts niveaux de ligands associés à la mort cellulaire, comme TRAIL, TNF $\alpha$ , FAS et FASL (Mundt et al., 2005; Pianko et al., 2001; Riordan et al., 2006).

Comme nous l'avons abordé dans le Chapitre 3, les études visant à définir les mécanismes associés au développement des dommages hépatiques et à l'apoptose liés directement ou indirectement au VHC sont encore assez limitées, surtout qu'il manque de façon flagrante des données mécanistiques. Il existe un certain nombre d'études, malheureusement assez conflictuelles, décrivant l'effet spécifique de certaines protéines virales sur des fonctions cellulaires comme l'apoptose. Des effets à la fois pro- et anti-apoptotiques ont été rapportés via les récepteurs de mort cellulaire et leur ligand comme le TNF- $\alpha$ , le CD95-ligand ou encore l'apoptose induite par TRAIL. Ainsi, il fut déjà suggéré que la NS5A puisse inhiber l'apoptose à travers différents mécanismes incluant la séquestration de p53, l'activation de NF $\kappa$ B, l'augmentation de l'expression de bcl-XL et de p21, ainsi que l'activation de la voie de survie PI3-kinase-Akt/PKB. La protéase NS3/4A inhiberait pour sa part la voie pro-apoptotique médiée par RIG-I via le clivage de CARDIF, tout en induisant l'apoptose via la caspase-8 (Yu et al., 2010). Nos observations à partir de l'analyse des microarrays suggèrent que la protéase NS3/4A aurait un effet inhibiteur sur l'apoptose dans le cadre d'une stimulation de la voie médiée par CARDIF, ce qui permettrait de retarder la mort cellulaire. Cela dit, nous avons observé une induction de la caspase-8 lié à l'expression de la NS3/4A, dans le



cadre d'une stimulation de la voie TLR3-TRIF. Un des biais majeur de l'ensemble des données disponibles à ce sujet est qu'elles ont été obtenues suite à l'expression des protéines virales individuelles à de très hauts niveaux comparativement aux niveaux observés au cours d'une infection *in vivo*. Il serait donc tout d'abord essentiel de confirmer nos observations dans un modèle infectieux en culture comme le JFH1 dans des hépatocytes primaires, mais également dans nos échantillons de biopsies de foies de patients chroniquement infectés. Il serait également nécessaire de mener des essais plus spécifiques à la détection d'une activité apoptotique, comme la détection du clivage de la procaspase-8 dans un premier temps, ainsi que la vérification de l'activité des caspases effectrices -3 et -7. Par la suite, nous pourrions envisager une caractérisation de la fonction de NS3/4A dans la régulation de l'apoptose en particulier dans un contexte où les voies médiées par TLR3 et RIG-I sont activées.

Le foie a une capacité de régénération unique; cet organe est en effet apte à récupérer à 70% et parfois 90% d'une hépatectomie partielle. Or le système de l'immunité innée est capable de détecter les dommages au foie, et de sécréter en réponse des cytokines inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , l'IL6 et le HGF (Hepatocyte Growth Factor), qui, par la suite, stimulent les hépatocytes à passer de la phase G0 à G1 puis S (Schwabe et al., 2006; Seki et Brenner, 2008). Nous avons abordé en introduction le fait que la voie de signalisation du TLR3 induisait deux cascades, la voie inflammatoire ou la voie apoptotique. Par ailleurs, il a été démontré que dans les lignées hépatocytaires, la voie de signalisation par le TLR3 est dirigée vers la cascade apoptotique (Khvalevsky et al., 2007). De plus, il fut démontré que suite à une hépatectomie partielle chez des souris knock-out pour TLR3, celles-ci étaient favorisées pour la régénération de leur foie comparé aux souris sauvages. En effet très tôt suivant une hépatectomie, la voie de signalisation médiée par TLR3 serait induite dans des hépatocytes, induisant donc NF $\kappa$ B et menant aussi à une augmentation de RIP3 et une activation de la caspase 8 (Zorde-Khvalevsky et al., 2009). Cette démonstration que l'activation de la voie de signalisation par TLR3 entraîne un délai dans la prolifération hépatique suite à une hépatectomie rejoint une autre théorie selon laquelle l'activation de la voie TLR3 par du poly(I:C) régulerait négativement la prolifération et donc la régénération du foie (Sun et Gao, 2004). Or des caractéristiques de l'infection chronique avec le VHC sont l'inflammation, la nécrose, les dommages hépatocellulaires et la fibrose. On pourrait donc envisager un scénario dans lequel la protéase NS3/4A interférerait avec la voie de TLR3 de façon à accélérer le processus de régénération hépatique, essentiel à la propagation du virus (communication personnelle de M. Bilodeau). Il est donc fondamental de reconsidérer l'activité de la NS3/4A dans un contexte inflammatoire où les voies antivirales sont activées, et dans des hépatocytes primaires qui possèdent des caractéristiques uniques en ce qui concerne la prolifération et la régulation de l'apoptose.

### 3. Hépatocytes chroniquement infectés et biopsies

Après avoir exploré la fonctionnalité d'une réponse antivirale « normale » dans des hépatocytes primaires humains non infectés ainsi que les activités de subversion de cette réponse par la protéase NS3/4A exprimée de façon ectopique, nous nous sommes également intéressés à la caractérisation de la réponse antivirale en cours dans un contexte d'infection chronique avec le VHC à partir de biopsies de foies provenant de patients chroniquement infectés.

Nous avons abordé en introduction la notion d'activation de la réponse antivirale observée au niveau des biopsies de patients chroniquement infectés avec le VHC, qui fit suite aux études pionnières menant à des observations semblables chez le chimpanzé. Ce phénomène, tout à fait contre-intuitif, est encore difficile à comprendre et à expliquer, dans la mesure où l'on associe plutôt la persistance du VHC à ses stratégies de subversion de l'immunité innée et donc à une absence de réponse antivirale dans les foies de patients chroniquement infectés. D'autre part, le traitement de choix anti-VHC repose sur du PEG-IFN, destiné lui-même à stimuler cette réponse antivirale supposée inexistante ou négligeable, un traitement qui n'est d'ailleurs efficace que dans 50% des cas.

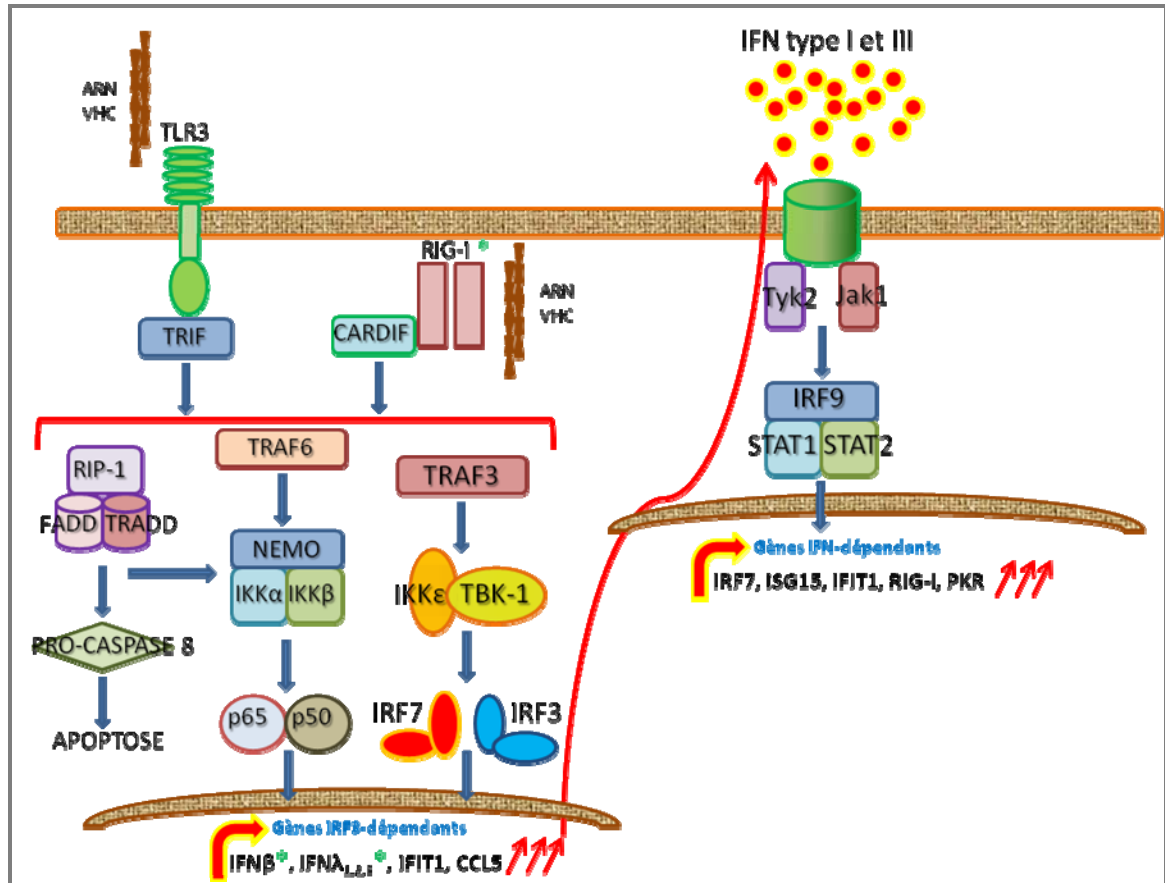
Un des grands débats soulevés depuis l'utilisation des biopsies pour l'étude à l'échelle du transcriptome d'une réponse antivirale dans le foie repose sur le fait que les biopsies contiennent 20% de cellules qui ne sont pas des hépatocytes. La participation des hépatocytes à la réponse antivirale observée dans les biopsies a régulièrement été remise en question dans la mesure où les infiltrats de cellules immunitaires dans le foie infecté sont relativement abondants et pourraient correspondre à une source importante d'IFN $\alpha/\beta$ . Quelle est donc la participation des hépatocytes dans cette réponse observée en tenant compte du fait que ce type cellulaire est la cible de choix du VHC et donc que les activités de subversion par le virus pourraient entraver cette réponse? Dans notre article 2, nous avons confirmé l'induction de l'expression de plusieurs ISGs dans des hépatocytes primaires purifiés provenant de biopsies de patients chroniquement infectés. Par ailleurs, la diminution de CARDIF, l'absence des IFNs de type I et III et les corrélations négatives que nous avons obtenues entre les niveaux d'ARNm d'ISGs induits et ceux d'ARN viral suggèrent une interférence virale.

Nous proposons donc que cette réponse antivirale observée dans des foies chroniquement infectés ne mène pas à une éradication du virus parce qu'elle est à la fois insuffisante et limitée par l'interférence avec la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire découlant du clivage de CARDIF. En parallèle, nous avons observé une induction minime de l'expression de CCL5, une

chemokine largement induite dans des hépatocytes normaux stimulés avec de l'ARNdb intra ou extracellulaire. Contrairement aux ISGs comme IFIT1, 2 et 3, CCL5 n'est pas induite par les IFNs de type I, et requiert plutôt IRF3. Nous proposons donc que l'induction des ISGs que nous observons dans nos échantillons de patients chroniquement infectés avec le VHC soit plutôt le résultat de la réponse IFN classique dû à de minimes quantités d'IFN plutôt qu'à l'activation de la voie CARDIF-dépendante.

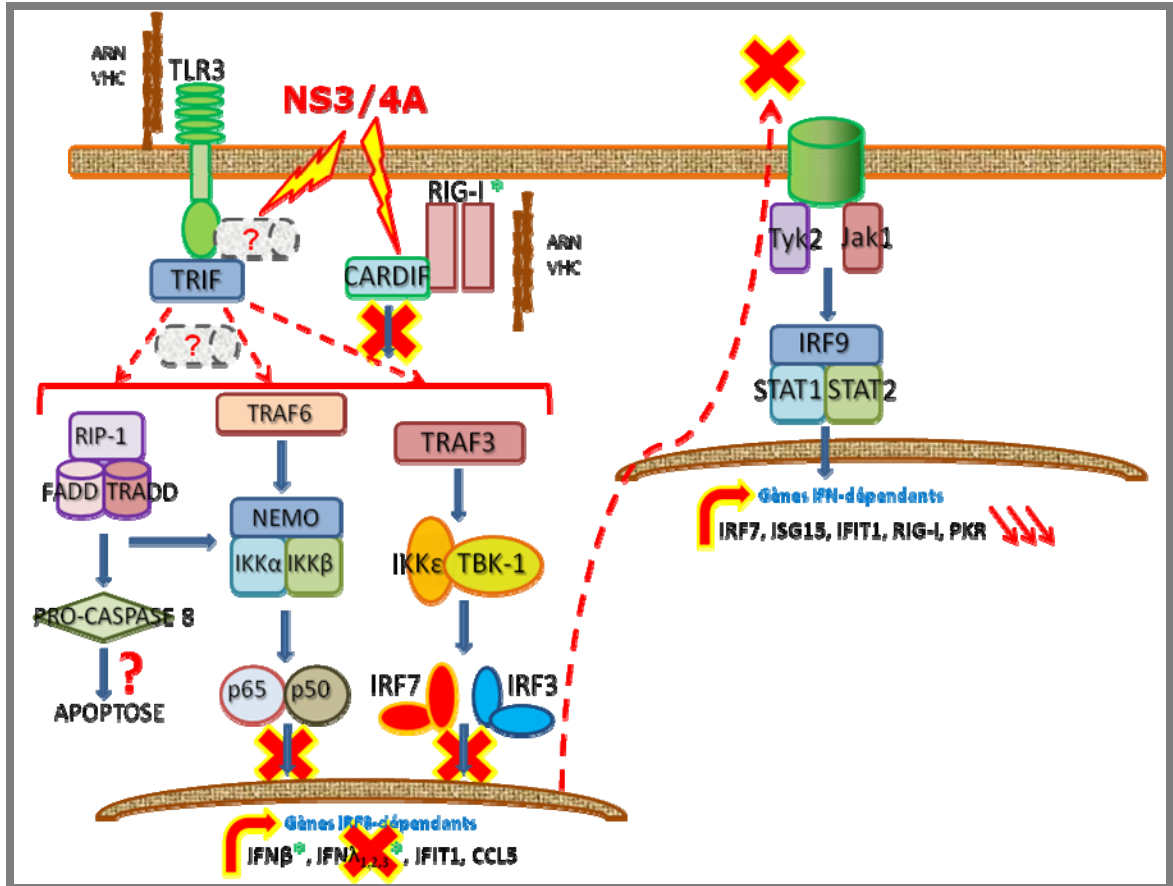
Une façon de confirmer cette hypothèse serait de dresser le profil d'expression génique d'hépatocytes primaires normaux en culture traités à l'IFN de type I, et de le comparer aux profils de plusieurs préparations d'hépatocytes purifiés provenant de biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC. Ainsi, nous pourrions vérifier si chez ces patients le profil d'expression génique porte la signature d'une activation de la voie classique des IFNs ou bien si les voies médiées par RIG-I et TLR3 sont encore fonctionnelles.

À la vue de nos résultats et de la récente étude de Lau et al., nous pourrions envisager un modèle dans lequel très tôt au cours de l'infection, l'ARN du VHC est reconnu par RIG-I et entraîne l'activation d'IRF3 ainsi que l'expression d'ISGs (**Fig. 2**). Cependant, une fois les protéines virales accumulées en quantité suffisante dans les cellules, NS3/4A serait capable de cliver CARDIF et de bloquer sa cascade de signalisation (**fig. 3**). L'expression des ISGs en phase chronique de l'infection découlerait donc quantités minimales d'IFNs sécrétés par des cellules nouvellement infectées ou d'IFN circulant (**Fig 4**). En effet, des études d'immunohistochimie et de microscopie confocale ont permis d'établir qu'*in vivo* dans un foie de patient chroniquement infecté avec le VHC, une faible fréquence d'hépatocytes exprime une version activée d'IRF3 au noyau, suggérant donc que certains hépatocytes présentent de l'IRF3 activé mais de façon transitoire (Lau et al., 2008). La persistance virale pourrait donc reposer en partie sur cet équilibre fragile entre des hépatocytes nouvellement infectés, la sécrétion d'IFN et d'ISGs puis l'inhibition de ces mêmes ISGs lorsque les protéines virales sont en quantité suffisante pour interférer avec la cascade de signalisation dans une cellule donnée, tout ceci de façon concomitante avec des effets du VHC sur la division cellulaire, l'apoptose, puis de nouvelles cibles susceptibles, et ce, indéfiniment.



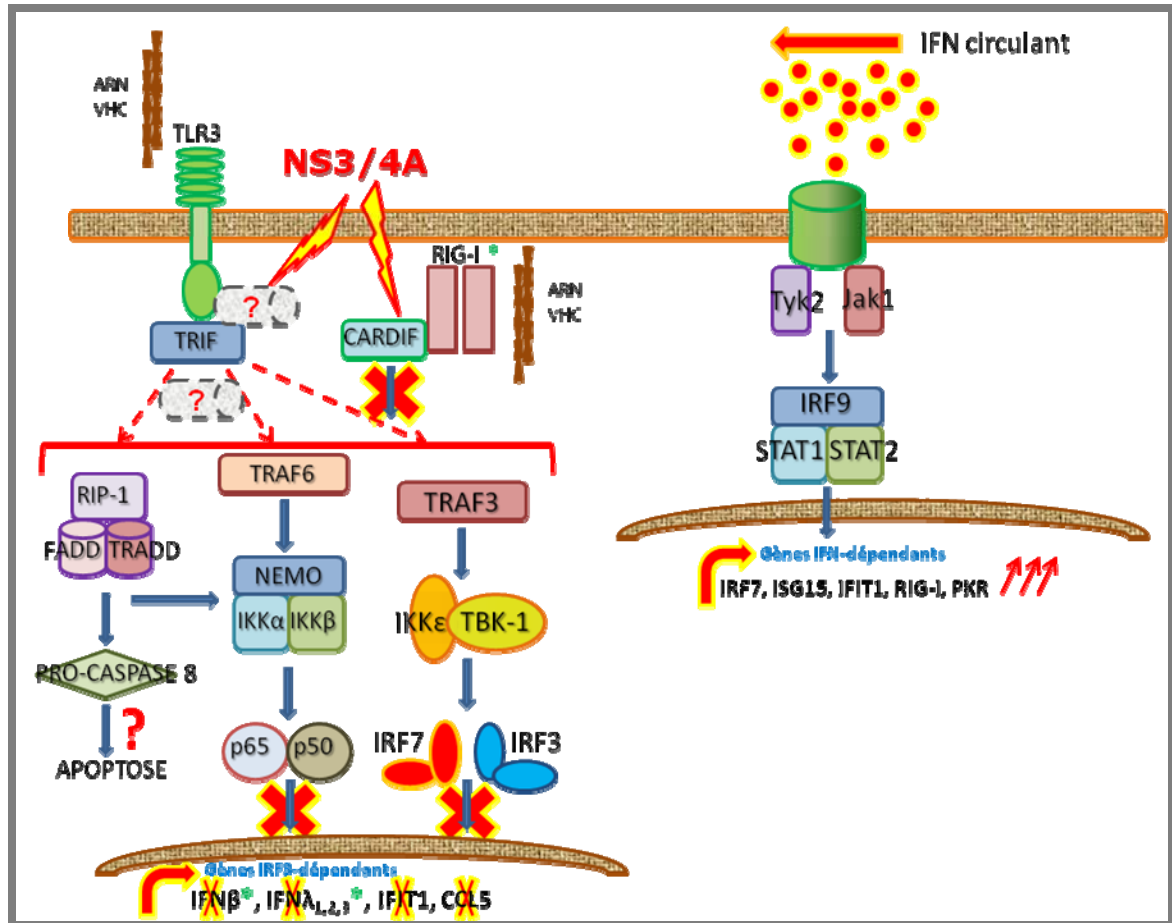
**Figure 2 :** La reconnaissance du VHC par des hépatocytes primaires humains

La détection d'acide nucléique dans le milieu extracellulaire par le TLR3 et dans le cytosol par RIG-I entraîne l'activation de cascades de signalisation aboutissant à la migration au noyau de facteurs de transcription-clé : IRF3, IRF7 et NFκB. Ceux-ci permettent la synthèse de gènes antiviraux précoces communs mais aussi spécifiques à chacune des voies (\*). Les IFNs de type I et III synthétisés permettront l'activation de la voie classique des IFNs permettant la synthèse de gènes IFN-dépendants, mais aussi d'une boucle d'amplification du signal.



**Figure 3 :** La subversion de l'immunité innée par la protéase NS3/4A du VHC dans des hépatocytes primaires humains

La protéase NS3/4A clive CARDIF et engendre un blocage de la cascade de signalisation qui se traduit par une diminution significative des gènes précoces dont l'expression dépend de la migration au noyau des facteurs de transcription-clé IRF3, IRF7 et NFκB. La voie classique des interférons et l'ensemble des gènes dépendants de l'interféron se retrouvent également significativement diminués. Le clivage de TRIF par NS3/4A n'a pas pu être démontré dans ce type cellulaire, mais il apparaît toutefois que certains gènes induits suite à une stimulation de la cascade de signalisation du TLR3 sont affectés. Plus particulièrement, des gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose ou de la mort cellulaire sont différenciellement régulés en présence de NS3/4A, et ce, de façon protéolytique-dépendante.



**Figure 4 :** La réponse immunitaire innée dans des hépatocytes primaires chroniquement infectés avec le VHC

Une diminution de CARDIF est observée chez des patients chroniquement infectés et certains gènes antiviraux précoces IRF3-dépendants comme les IFNs de type I et III ou la chémokine CCL5 sont sévèrement interférés. Par contre, les gènes IFN-dépendants dont la synthèse découle de l'activation de la voie classique des interférons sont détectés. Il est envisageable que la présence d'IFN de type I circulant permette la synthèse de gènes antiviraux-clé néanmoins insuffisants pour éradiquer l'infection virale.

Un dernier volet de notre projet a consisté à caractériser la fonctionnalité des voies de détection de l'ARNdb intra et extracellulaire dans des cultures d'hépatocytes primaires humains chroniquement infectés avec le VHC dans lesquelles nous avons détecté la protéase virale NS3/4A ainsi que de hauts niveaux d'ARN viral cellulaire et sécrété dans le milieu de culture (**Annexe 1, Table S1 et Fig. S1 et Annexe 3**). Contrairement à ce que nous avons observé dans des hépatocytes isolés à partir des biopsies de foie de patients chroniquement infectés avec le VHC, dans lesquels de hauts niveaux d'ISGs étaient détectables, aucune différence significative entre ces hépatocytes chroniquement infectés une fois mis en culture et nos contrôles normaux n'a été obtenue avant la stimulation (**Annexe 1, Fig. S5**). Il est envisageable que la mise en culture des

hépatocytes chroniquement infectés, leur attachement et leur maintien en culture pendant 24 à 48 hrs affectent l'expression génique des ISGs au profit d'autres groupes fonctionnels de gènes comme ceux codant pour des protéines du cytosquelette ou encore du métabolisme. Nous avons conduit des études de dose-réponse et de cinétique dans ces préparations et avons obtenu des niveaux d'induction des gènes antiviraux-clé comparables à ceux obtenus avec les préparations d'hépatocytes normaux (**Annexe 1, Fig. S3 et S4**). Ces expériences suggèrent donc que la fonctionnalité des voies de signalisation antivirale des hépatocytes primaires chroniquement infectés avec le VHC et mis en culture est conservée.

Si nos expériences dans des hépatocytes directement isolés à partir de biopsies de patients chroniquement infectés sans mise en culture suggèrent une diminution et dans certains cas un clivage de CARDIF, nos essais dans ces mêmes cellules une fois mises en culture ne nous ont pas permis d'en conclure autant (données non présentées). Il est possible qu'une fois mis en culture, les niveaux de NS3/4A soient trop faibles dans les hépatocytes et donc insuffisants pour interférer significativement avec la voie de signalisation. Étant donné qu'il y a de plus en plus d'évidences que les hépatocytes infectés dans une biopsie de foie sont localisés dans des noyaux d'infection bien délimités (Stiffler et al., 2009), il est aussi envisageable que la réponse mesurée ne corresponde pas à celle des hépatocytes infectés. Une détermination du pourcentage de cellules infectées dans nos préparations d'hépatocytes primaires nous permettrait de répondre à la question fondamentale du nombre de cellules infectées dans un foie chroniquement infecté avec le VHC. Cela dit, la mesure du taux de cellules infectées dans ces préparations reste malheureusement difficile, dans la mesure où la microscopie à fluorescence se voit compliquée par une autofluorescence typique des hépatocytes primaires qui rend encore plus difficile la détection d'un signal au préalable faible. Ainsi, nos différents essais employant des techniques d'amplification du signal primaire en immunofluorescence et en immunohistochimie n'ont jamais abouti à une détermination claire du pourcentage de cellules infectées dans nos préparations. Une autre possibilité serait d'utiliser la cytométrie en flux, qui nous permettrait de sélectionner les hépatocytes infectés et d'y caractériser la fonctionnalité de leurs voies de signalisation à l'échelle cellulaire, probablement la seule façon de détecter un défaut et de le corrélérer à un mécanisme d'interférence virale.

Pour ce qui est de la réponse antivirale suite à l'exposition des hépatocytes primaires chroniquement infectés avec le VHC à l'ARNdb extracellulaire, il est intéressant de noter que seul l'IFN $\beta$  présente des niveaux d'induction différents des hépatocytes normaux (**Annexe 1, Fig. S5**). En effet, nous avons préalablement discuté de la régulation stricte de l'IFN $\beta$  dans le cadre de la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire dans des hépatocytes primaires normaux. Dans ces

derniers, le pic d'expression de l'ARNm codant pour l'IFN $\beta$  est obtenu après 3 heures de stimulation après lesquelles le niveau d'expression retombe à celui de base. Or il existe une variabilité quant à cette régulation dans les différentes préparations d'hépatocytes primaires chroniquement infectés. Effectivement, les niveaux d'induction d'IFN $\beta$  restent élevés après 6 hrs alors que pour les normaux, les niveaux sont quasiment indétectables. Le fait que nous observions une prolongation de l'induction d'IFN $\beta$  dans le cadre d'une stimulation de la voie TLR3 dans des hépatocytes chroniquement infectés avec le VHC suggère qu'un régulateur central de cette voie puisse être affecté. Pour le confirmer, il serait particulièrement intéressant de dresser le profil d'expression à l'échelle du transcriptome d'hépatocytes primaires chroniquement infectés avec le VHC dans le contexte d'une stimulation de la voie TLR3 et de le comparer à la signature obtenue avec des hépatocytes normaux.

Une autre hypothèse à considérer serait que la prolongation de l'induction de l'IFN $\beta$  puisse découler d'une stratégie virale. En effet, au cours d'une infection avec le HPV, une faible quantité d'IFNs de type I stimule la transcription précoce du génome viral ainsi que sa réplication et ce via l'attachement du facteur cellulaire IRF1 au niveau de promoteurs majeurs de gènes précoces du virus (Lace et al., 2009). Il existe d'autres virus comme le HSV-1 dans des lignées cellulaires fibroblastiques, qui mènent à la stabilisation de l'ARNm codant pour l'IFN $\beta$ , via la protéine ICP27 qui s'attache aux régions riches en séquences AU (Brown et al., 1995; Mosca et al., 1992; Peppel et al., 1991). On pourrait donc envisager ce défaut de régulation de la transcription de l'IFN $\beta$  dans le cadre de la voie TLR3 comme une stratégie de subversion par le VHC. Si tel est le cas, l'induction des ISGs dans le contexte d'une infection chronique avec le VHC sans éradication concomitante du virus pourrait alors s'expliquer. Cependant, une meilleure compréhension de la régulation de la transcription de l'IFN $\beta$  dans le cadre de l'activation de la voie TLR3 dans un contexte normal est avant tout nécessaire. Il sera par la suite plus aisé de comprendre cette régulation en présence du VHC.

#### **4. L'énigme des infections virales persistantes: quelles attentes vis-à-vis des traitements antiviraux?**

Il est maintenant clairement établi qu'il existe une réponse antivirale en cours sur les lieux de l'infection, et ce malgré les mécanismes de subversion mis en place par le VHC. Ainsi, il y aurait pendant plusieurs décennies une cohabitation particulière entre un virus capable de détourner la



réponse antivirale, et des cellules qui répondent à l'infection virale mais néanmoins de façon inefficace puisque le virus persiste.

Dans le contexte d'autres infections virales, les études transcriptomiques ont révélé des exemples de virus hautement pathogènes réellement efficaces pour inhiber l'expression des ISGs, comme le Filovirus (Kash et al., 2006). On y retrouve en effet la suppression complète de gènes antiviraux-clé, en particulier ceux induits par IRF3. En fait, il y aurait une corrélation positive entre le phénomène de l'interférence virale avec la réponse IFN de l'hôte et la virulence du virus. Il en est de même pour d'autres virus hautement virulents, comme le virus Ebola du Zaïre et le Marburgvirus, qui inhibent l'expression de la majorité des ISGs chez l'hôte. D'un autre côté, le virus Reston Ebola non-pathogène a une activité d'interférence avec la réponse immunitaire de l'hôte moins forte, permettant l'expression de 20% des ISGs. Des expérimentations chez la souris par exemple, ont d'ailleurs révélé que l'infection avec un virus atténué, résultait à la fois en une inflammation ainsi qu'en une induction d'ISGs. La pathogénicité d'un virus reposerait en partie sur sa capacité d'interférence avec la réponse antivirale lui permettant d'atteindre de très hauts niveaux de réplication le rendant particulièrement virulent (Brukman et Enquist, 2006a, 2006b).

Il est donc théoriquement possible pour un virus d'interférer totalement avec le système inné de l'hôte, mais ce n'est pas le cas pour une infection persistante comme l'hépatite C qui est caractérisée par une progression lente. C'est un peu comme s'il y avait toujours eu une pression de sélection faisant en sorte que des virus persistants n'ont pas besoin d'interférer drastiquement avec la réponse de l'hôte, cette réponse pouvant même être utilisée par le virus. De plus, une réponse modérée chez l'hôte permet au virus persistant de se maintenir à des niveaux relativement bas, sans trop interférer avec les fonctions de son hôte, en préservant donc son « hébergement ». Des virus plus agressifs, qui interfèrent tout à fait avec la réponse de l'hôte semblent plutôt miser sur des niveaux de réplication élevés permettant de faciliter la propagation du virus et sa transmission.

Dans l'infection avec le VHC, c'est cet équilibre entre la réponse antivirale de l'hôte et les stratégies de subversion virales qui reste encore énigmatique et qui rend la découverte d'un traitement efficace complexe et encore incertaine. Cependant, une meilleure compréhension de l'établissement de cette persistance virale et de l'effet limité des traitements antiviraux existant nous rapproche de la découverte d'une stratégie efficace menant à une éradication complète du virus. Plus particulièrement, les réponses immunitaires de l'hôte qui permettraient la clairance virale ou au contraire engendreraient sa persistance restent encore obscures. Il est donc urgent de définir quels

sont les paramètres que l'on pourrait associer avec une immunité protectrice et quels sont les mécanismes mis en place par le virus pour la contrer.

Une meilleure compréhension de l'infection avec le VHC demande en effet de prendre en compte une combinaison de plusieurs paramètres: à la fois les effets directs dus au virus en tant que tel, les effets découlant de l'interaction virus-hôte et finalement, les effets induits par l'hôte uniquement. Dans l'article 2, nous avons démontré que la voie de signalisation des IFNs de type I est activée dans les hépatocytes chroniquement infectés avec le VHC. Par contre, nous avons également mis en évidence l'interférence de la voie précoce de détection de l'ARNdb dû à un défaut de la voie de signalisation CARDIF-dépendante non réparé par l'activation de la voie classique des IFNs. Par ailleurs, la thérapie basée sur l'administration d'IFN $\alpha$  pégylé et de ribavirine échoue chez environ la moitié des patients. Des observations récentes par plusieurs équipes démontrent que les niveaux d'ISGs dans le foie chroniquement infecté avant le début de la thérapie jouent un rôle déterminant pour l'éradication du virus. Dans l'étude de Chen et al., il est clairement démontré que le profil d'expression génique de biopsies de foies provenant de patients chroniquement infectés diffère significativement pour au moins 18 gènes, ce qui permettrait de distinguer les futurs répondeurs et non répondeurs (Chen et al., 2005a). Cette observation contre-intuitive dans laquelle c'est finalement l'induction d'une réponse antivirale qui est anormale et non son interférence comme on pourrait le penser fut par la suite confirmée par deux autres études (Asselah et al., 2009; Feld et al., 2007). En effet, des hauts niveaux d'ISGs ne corrélaient absolument pas avec une diminution de la virémie, chez le chimpanzé comme chez l'humain (Chen et al., 2005a; Lanford et al., 2007; Sarasin-Filipowicz et al., 2008). De plus, l'absence d'une induction préalable des ISGs dans le foie corréla avec une réponse rapide et complète des patients suite à une administration d'IFN (Sarasin-Filipowicz et al., 2008). Une des plus grandes interrogations qui demeure à propos de la persistance virale et de l'échec des traitements basés sur l'IFN au cours d'une infection avec le VHC repose donc sur le fait que des patients qui présentent une réponse antivirale n'éliminent pas nécessairement le virus, et qu'au contraire d'autres patients chez qui une réponse antivirale préalable est inexistante seront plus apte à éliminer le virus, et ce de façon tout à fait indépendante de la charge virale détectée chez le patient. Une des hypothèses repose sur le fait qu'une stimulation continue du système de la boucle IFN endogène pourrait saturer le système et induire un état réfractaire au niveau hépatique (Sarasin-Filipowicz et al., 2009). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression intrahépatique du régulateur négatif de la voie IFN classique SOCS3 contribuerait également à l'absence de réponse au traitement IFN chez des chimpanzés infectés avec le VHC (Huang et al., 2007b). On pourrait donc faire l'hypothèse qu'une stimulation de la voie classique des IFNs engendre également une stimulation des mécanismes de régulation de cette même voie

(Walsh et al., 2006). Cela dit, nos résultats préliminaires à ce sujet n'appuient pas cette théorie puisque nous n'avons pas détecté une induction significative de SOCS3 dans nos échantillons de patients chroniquement infectés avec le VHC. La relation entre l'échec de ce traitement et les niveaux d'induction des voies de signalisation inhibitrices de l'IFN de type I n'est donc pas aussi claire que celle établie entre les niveaux d'ISGs avant le traitement et l'échec de la thérapie (Huang et al., 2007b).

Très récemment, Chen et al. ont proposé de différencier deux états d'activation des ISGs chez des patients chroniquement infectés : dans le premier, de hauts niveaux d'expression d'ISGs sont retrouvés dans les hépatocytes, un phénotype associé à un mauvais pronostic; dans le second, de hauts niveaux d'ISGs sont plutôt retrouvés dans les macrophages tissulaires, ce qui représente un meilleur pronostic de réponse au traitement IFN (Chen et al., 2010). Si l'on ajoute à cette observation le fait que des défauts de signalisation induits par le VHC dans les mDCs ont clairement été démontrés, et sachant que celles-ci jouent un rôle-clé dans l'immunité innée et représentent un pont entre immunité innée et acquise, alors ceci implique qu'il faudra probablement remettre en perspective l'ensemble des données relatives à l'immunité innée et acquise pour avoir une meilleure compréhension de la persistance virale dans le cas d'une infection avec le VHC.

## 5. Perspectives futures

Une des difficultés de la recherche portant sur l'infection avec le VHC repose sur la faible accessibilité à des modèles adéquats pour l'étude des voies de signalisation antivirales et les interactions virus/hôte. Cela dit, nos études utilisant des mimes d'infections virales dans des hépatocytes primaires humains ont permis d'améliorer nos connaissances sur la fonctionnalité de ces voies. Une des priorités serait de mettre en place un système d'approvisionnement en hépatocytes primaires humains régulier afin d'approfondir nos études de caractérisation fonctionnelle des voies antivirales, ainsi que d'y mettre en place le modèle infectieux du JFH-1. Ainsi, il serait intéressant de poursuivre avec les essais utilisant des siRNA dirigés contre différents récepteurs et adaptateurs des cascades de signalisation impliquées dans la reconnaissance de l'ARNdb, entre autre de déterminer si le TLR3 est réellement impliqué dans la reconnaissance du VHC. L'utilisation d'une banque de shRNA dans des hépatocytes primaires nous permettrait d'approfondir ces cascades de signalisation, mais aussi de mettre en lumière d'autres récepteurs ou adaptateurs impliqués dans ces voies de reconnaissance et qui pourraient représenter de nouvelles plateformes d'interactions virus/hôte. Comme nous l'avons abordé plus haut, une meilleure compréhension de la régulation transcriptionnelle de l'IFN $\beta$  et de sa cinétique d'induction en

particulier au cours de la stimulation de la voie médiée par le TLR3 serait particulièrement intéressante dans la mesure où dans des hépatocytes chroniquement infectés avec le VHC, l'expression de l'IFN $\beta$  est dérégulée.

D'autre part, notre étude de microarrays a non seulement confirmé des mécanismes d'interférence de l'immunité innée par le VHC, mais a également permis de mettre en lumière de nouveaux effets de la NS3/4A sur la régulation de l'apoptose et du programme de mort cellulaire dans le cadre d'une réponse antivirale en cours médiée par RIG-I. Suite à une validation de l'activation des caspases effectrices dans des hépatocytes de patients chroniquement infectés avec le VHC, nous pourrions étudier plus en détail dans un modèle d'hépatocytes primaires en culture infectés avec le JFH-1, la mise en place de ces événements apoptotiques. En effet, si le pont entre immunité et apoptose est maintenant clairement établi, en ce qui concerne les stratégies virales particulièrement dans le contexte d'un virus persistant comme le VHC, peu de choses sont connues à propos de la carcinogénèse associée au VHC. Finalement, puisque nous avons déjà les profils d'expression génique d'hépatocytes primaires stimulés avec de l'ARNdb extra et intracellulaire, il serait intéressant de procéder à d'autres analyses microarrays sur nos échantillons d'hépatocytes primaires chroniquement infectés et soumis aux mêmes stimulations afin de les comparer. Nous pourrions vérifier ainsi si chez ces patients le profil d'expression génique porte la signature d'une activation de la voie classique des IFNs ou bien si les voies médiées par RIG-I et TLR3 sont encore fonctionnelles. Ces études nous permettront de mieux comprendre l'échec du traitement basé sur l'IFN-PEG et la ribavirine et d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## CONCLUSION

Tout au long de cette thèse, nous avons abordé la persistance virale dans le cadre de l'infection avec le VHC sous des angles différents pour en venir finalement au constat que malgré la compréhension d'un certains nombres de stratégies virales pour contrer la réponse immune de l'hôte, beaucoup de travail reste encore à effectuer notamment en vue de comprendre l'adaptation du VHC à un environnement pourtant hostile. Alors que nous pensions observer un blocage complet des voies de l'immunité innée, nous avons plutôt observé une réponse antivirale de l'hôte qui pourrait finalement jouer en faveur de la persistance du VHC. En effet, le VHC semble plutôt élaborer des stratégies de subversion visant à réguler l'immunité innée plutôt que de la bloquer complètement. À l'avenir, il serait essentiel de commencer par avoir une meilleure compréhension des voies de signalisation antivirales de l'hôte et de leur point de régulation, ce qui nous donnerait probablement des outils supplémentaires puissants afin de mieux comprendre l'éventail des stratégies de subversion du VHC. De plus, nous avons vu que les concepts d'immunité et d'apoptose se recoupent largement, un domaine qu'il serait particulièrement important d'exploiter puisqu'il semble que le virus est en mesure pour sa part de cibler plusieurs cascades appartenant à des catégories fonctionnelles différentes et d'en tirer profit.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aaskov, J., Buzacott, K., Thu, H. M., Lowry, K., & Holmes, E. C. (2006). Long-term transmission of defective RNA viruses in humans and *Aedes* mosquitoes. *Science*, *311*(5758), 236-238.
- Abe, T., Kaname, Y., Hamamoto, I., Tsuda, Y., Wen, X., Taguwa, S., et al. (2007). Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J Virol*, *81*(17), 8953-8966.
- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T., & Thanos, D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*, *103*(4), 667-678.
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, *4*(7), 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, *413*(6857), 732-738.
- Alff, P. J., Sen, N., Gorbunova, E., Gavrilovskaya, I. N., & Mackow, E. R. (2008). The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation. *J Virol*, *82*(18), 9115-9122.
- Aly, H. H., Watashi, K., Hijikata, M., Kaneko, H., Takada, Y., Egawa, H., et al. (2007). Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol*, *46*(1), 26-36.
- Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S., et al. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(49), 17264-17269.
- Ank, N., West, H., & Paludan, S. R. (2006). IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *J Interferon Cytokine Res*, *26*(6), 373-379.
- Anthony, D. D., Yonkers, N. L., Post, A. B., Asaad, R., Heinzl, F. P., Lederman, M. M., et al. (2004). Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol*, *172*(8), 4907-4916.
- Appel, N., Pietschmann, T., & 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), 3187-3194.
- Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., et al. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog*, *4*(3), e1000035.
- Arimoto, K., Takahashi, H., Hishiki, T., Konishi, H., Fujita, T., & Shimotohno, K. (2007). Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(18), 7500-7505.
- Ariumi, Y., Kuroki, M., Abe, K., Dansako, H., Ikeda, M., Wakita, T., et al. (2007). DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, *81*(24), 13922-13926.
- Asselah, T., Bieche, I., Sabbagh, A., Bedossa, P., Moreau, R., Valla, D., et al. (2009). Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut*, *58*(6), 846-858.
- Auffermann-Gretzinger, S., Keeffe, E. B., & Levy, S. (2001). Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood*, *97*(10), 3171-3176.
- Aupperle, K. R., Yamanishi, Y., Bennett, B. L., Mercurio, F., Boyle, D. L., & Firestein, G. S. (2001). Expression and regulation of inducible I kappa B kinase (IKK-i) in human fibroblast-like synoviocytes. *Cell Immunol*, *214*(1), 54-59.

- Bacon, B. R., & McHutchison, J. G. (2007). Into the light: strategies for battling hepatitis C. *Am J Manag Care, 13 Suppl 12*, S319-326.
- Badr, G., Bedard, N., Abdel-Hakeem, M. S., Trautmann, L., Willems, B., Villeneuve, J. P., et al. (2008). Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8+ memory T cells. *J Virol, 82*(20), 10017-10031.
- Bain, V. G., Kaita, K. D., Yoshida, E. M., Swain, M. G., Heathcote, E. J., Neumann, A. U., et al. (2006). A phase 2 study to evaluate the antiviral activity, safety, and pharmacokinetics of recombinant human albumin-interferon alfa fusion protein in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Hepatol, 44*(4), 671-678.
- Balachandran, S., Roberts, P. C., Kipperman, T., Bhalla, K. N., Compans, R. W., Archer, D. R., et al. (2000). Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J Virol, 74*(3), 1513-1523.
- Bamming, D., & Horvath, C. M. (2009). Regulation of signal transduction by enzymatically inactive antiviral RNA helicase proteins MDA5, RIG-I, and LGP2. *J Biol Chem, 284*(15), 9700-9712.
- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., et al. (1997). Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A, 94*(4), 1200-1205.
- Baril, M., Racine, M. E., Penin, F., & Lamarre, D. (2008). MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of HCV NS3/4A protease. *J Virol*.
- Barral, P. M., Morrison, J. M., Drahos, J., Gupta, P., Sarkar, D., Fisher, P. B., et al. (2007). MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J Virol, 81*(8), 3677-3684.
- Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., & Jacobsen, H. (1994). Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol, 68*(8), 5045-5055.
- Bartenschlager, R., & Sparacio, S. (2007). Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Res, 127*(2), 195-207.
- Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest, 115*(2), 209-218.
- Bates, S., & Vousden, K. H. (1996). p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev, 6*(1), 12-18.
- Bell, J. K., Botos, I., Hall, P. R., Askins, J., Shiloach, J., Davies, D. R., et al. (2006). The molecular structure of the TLR3 extracellular domain. *J Endotoxin Res, 12*(6), 375-378.
- Besch, R., Poeck, H., Hohenauer, T., Senft, D., Hacker, G., Berking, C., et al. (2009). Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest, 119*(8), 2399-2411.
- Bevilacqua, P. C., Sugimoto, N., & Turner, D. H. (1996). A mechanistic framework for the second step of splicing catalyzed by the Tetrahymena ribozyme. *Biochemistry, 35*(2), 648-658.
- Bibeau-Poirier, A., Gravel, S. P., Clement, J. F., Rolland, S., Rodier, G., Coulombe, P., et al. (2006). Involvement of the IkappaB kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation. *J Immunol, 177*(8), 5059-5067.
- Bieche, I., Asselah, T., Laurendeau, I., Vidaud, D., Degot, C., Paradis, V., et al. (2005). Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology, 332*(1), 130-144.
- Bigger, C. B., Brasky, K. M., & Lanford, R. E. (2001). DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol, 75*(15), 7059-7066.
- Bigger, C. B., Guerra, B., Brasky, K. M., Hubbard, G., Beard, M. R., Luxon, B. A., et al. (2004). Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees. *J Virol, 78*(24), 13779-13792.
- Bilzer, M., Roggel, F., & Gerbes, A. L. (2006). Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int, 26*(10), 1175-1186.

- Biswal, B. K., Cherney, M. M., Wang, M., Chan, L., Yannopoulos, C. G., Bilimoria, D., et al. (2005). Crystal structures of the RNA-dependent RNA polymerase genotype 2a of hepatitis C virus reveal two conformations and suggest mechanisms of inhibition by non-nucleoside inhibitors. *J Biol Chem*, 280(18), 18202-18210.
- Blanc, P., Etienne, H., Daujat, M., Fabre, I., Zindy, F., Domergue, J., et al. (1992). Mitotic responsiveness of cultured adult human hepatocytes to epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and human serum. *Gastroenterology*, 102(4 Pt 1), 1340-1350.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., et al. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 80(14), 6964-6972.
- Blight, K. J., Kolykhalov, A. A., & Rice, C. M. (2000). Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*, 290(5498), 1972-1974.
- Blight, K. J., McKeating, J. A., Marcotrigiano, J., & Rice, C. M. (2003). Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol*, 77(5), 3181-3190.
- Blight, K. J., McKeating, J. A., & Rice, C. M. (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, 76(24), 13001-13014.
- Bluyssen, H. A., Muzaffar, R., Vlieststra, R. J., van der Made, A. C., Leung, S., Stark, G. R., et al. (1995). Combinatorial association and abundance of components of interferon-stimulated gene factor 3 dictate the selectivity of interferon responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), 5645-5649.
- Bode, J. G., Ludwig, S., Ehrhardt, C., Albrecht, U., Erhardt, A., Schaper, F., et al. (2003). IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J*, 17(3), 488-490.
- Bolitho, P., Voskoboinik, I., Trapani, J. A., & Smyth, M. J. (2007). Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol*, 19(3), 339-347.
- Boone, D. L., Turer, E. E., Lee, E. G., Ahmad, R. C., Wheeler, M. T., Tsui, C., et al. (2004). The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol*, 5(10), 1052-1060.
- Boonstra, A., van der Laan, L. J., Vanwolleghem, T., & Janssen, H. L. (2009). Experimental models for hepatitis C viral infection. *Hepatology*, 50(5), 1646-1655.
- Borden, E. C., Sen, G. C., Uze, G., Silverman, R. H., Ransohoff, R. M., Foster, G. R., et al. (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov*, 6(12), 975-990.
- Bosch, F. X., Ribes, J., Diaz, M., & Cleries, R. (2004). Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*, 127(5 Suppl 1), S5-S16.
- Boulant, S., Targett-Adams, P., & 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), 2204-2213.
- Bowen, D. G., & Walker, C. M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*, 436(7053), 946-952.
- Bowie, A. G., & Unterholzner, L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 8(12), 911-922.
- Branch, A. D., Stump, D. D., Gutierrez, J. A., Eng, F., & 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), 105-117.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wolk, B., Hellings, J. A., Blum, H. E., et al. (2002). An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem*, 277(10), 8130-8139.



- Brazzoli, M., Helenius, A., Fong, S. K., Houghton, M., Abrignani, S., & Merola, M. (2005). Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells. *Virology*, *332*(1), 438-453.
- Brennan, C. A., & Anderson, K. V. (2004). Drosophila: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu Rev Immunol*, *22*, 457-483.
- Brooks, D. G., Trifilo, M. J., Edelmann, K. H., Teyton, L., McGavern, D. B., & Oldstone, M. B. (2006). Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med*, *12*(11), 1301-1309.
- Brown, C. R., Nakamura, M. S., Mosca, J. D., Hayward, G. S., Straus, S. E., & Perera, L. P. (1995). Herpes simplex virus trans-regulatory protein ICP27 stabilizes and binds to 3' ends of labile mRNA. *J Virol*, *69*(11), 7187-7195.
- Brukman, A., & Enquist, L. W. (2006a). Pseudorabies virus EP0 protein counteracts an interferon-induced antiviral state in a species-specific manner. *J Virol*, *80*(21), 10871-10873.
- Brukman, A., & Enquist, L. W. (2006b). Suppression of the interferon-mediated innate immune response by pseudorabies virus. *J Virol*, *80*(13), 6345-6356.
- Brzozka, K., Finke, S., & Conzelmann, K. K. (2005). Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*, *79*(12), 7673-7681.
- Buck, M. (2008). Direct infection and replication of naturally occurring hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3 and 4 in normal human hepatocyte cultures. *PLoS One*, *3*(7), e2660.
- Buck, M., & Chojkier, M. (1996). Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J*, *15*(8), 1753-1765.
- Buck, M., Poli, V., Hunter, T., & Chojkier, M. (2001a). C/EBPbeta phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. *Mol Cell*, *8*(4), 807-816.
- Buck, M., Zhang, L., Halasz, N. A., Hunter, T., & Chojkier, M. (2001b). Nuclear export of phosphorylated C/EBPbeta mediates the inhibition of albumin expression by TNF-alpha. *EMBO J*, *20*(23), 6712-6723.
- Bukh, J. (2004). A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology*, *39*(6), 1469-1475.
- Bukh, J., Apgar, C. L., & Yanagi, M. (1999). Toward a surrogate model for hepatitis C virus: An infectious molecular clone of the GB virus-B hepatitis agent. *Virology*, *262*(2), 470-478.
- Bukh, J., Pietschmann, T., Lohmann, V., Krieger, N., Faulk, K., Engle, R. E., et al. (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), 14416-14421.
- Cabot, B., Martell, M., Esteban, J. I., Sauleda, S., Otero, T., Esteban, R., et al. (2000). Nucleotide and amino acid complexity of hepatitis C virus quasispecies in serum and liver. *J Virol*, *74*(2), 805-811.
- Canbay, A., Higuchi, H., Bronk, S. F., Taniai, M., Sebo, T. J., & Gores, G. J. (2002). Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology*, *123*(4), 1323-1330.
- Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., & Morgan, R. A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(17), 9742-9747.
- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., & Dubuisson, J. (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol*, *76*(8), 3720-3730.
- Carroll, S. S., Ludmerer, S., Handt, L., Koeplinger, K., Zhang, N. R., Graham, D., et al. (2009). Robust antiviral efficacy upon administration of a nucleoside analog to hepatitis C virus-infected chimpanzees. *Antimicrob Agents Chemother*, *53*(3), 926-934.

- Carroll, S. S., & Olsen, D. B. (2006). Nucleoside analog inhibitors of hepatitis C virus replication. *Infect Disord Drug Targets*, 6(1), 17-29.
- Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P. N., & Bowie, A. G. (2006). The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*, 7(10), 1074-1081.
- Cattaneo, R. (1994). RNA editing. RNA duplexes guide base conversions. *Curr Biol*, 4(2), 134-136.
- Chang, J., Guo, J. T., Jiang, D., Guo, H., Taylor, J. M., & Block, T. M. (2008). Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J Virol*, 82(16), 8215-8223.
- Chang, K. S., Cai, Z., Zhang, C., Sen, G. C., Williams, B. R., & Luo, G. (2006). Replication of hepatitis C virus (HCV) RNA in mouse embryonic fibroblasts: protein kinase R (PKR)-dependent and PKR-independent mechanisms for controlling HCV RNA replication and mediating interferon activities. *J Virol*, 80(15), 7364-7374.
- Chang, K. S., Jiang, J., Cai, Z., & Luo, G. (2007a). Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol*, 81(24), 13783-13793.
- Chang, S., Dolganiuc, A., & Szabo, G. (2007b). Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J Leukoc Biol*, 82(3), 479-487.
- Chavez, D., Guerra, B., & Lanford, R. E. (2009). Antiviral activity and host gene induction by tamarin and marmoset interferon-alpha and interferon-gamma in the GBV-B primary hepatocyte culture model. *Virology*, 390(2), 186-196.
- Chen, C. M., He, Y., Lu, L., Lim, H. B., Tripathi, R. L., Middleton, T., et al. (2007). Activity of a potent hepatitis C virus polymerase inhibitor in the chimpanzee model. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(12), 4290-4296.
- Chen, L., Borozan, I., Feld, J., Sun, J., Tannis, L. L., Coltescu, C., et al. (2005a). Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology*, 128(5), 1437-1444.
- Chen, L., Borozan, I., Sun, J., Guindi, M., Fischer, S., Feld, J., et al. (2010). Cell-type specific gene expression signature in liver underlies response to interferon therapy in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology*, 138(3), 1123-1133 e1121-1123.
- Chen, S. L., & Morgan, T. R. (2006). The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*, 3(2), 47-52.
- Chen, X. M., O'Hara, S. P., Nelson, J. B., Splinter, P. L., Small, A. J., Tietz, P. S., et al. (2005b). Multiple TLRs are expressed in human cholangiocytes and mediate host epithelial defense responses to *Cryptosporidium parvum* via activation of NF-kappaB. *J Immunol*, 175(11), 7447-7456.
- Cheng, G., Zhong, J., & Chisari, F. V. (2006). Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(22), 8499-8504.
- Chin, K. C., & Cresswell, P. (2001). Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26), 15125-15130.
- Choe, J., Kelker, M. S., & Wilson, I. A. (2005). Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*, 309(5734), 581-585.
- Cholongitas, E., & Papatheodoridis, G. V. (2008). Review article: novel therapeutic options for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*, 27(10), 866-884.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902), 359-362.
- Chung, R. T., Gale, M., Jr., Polyak, S. J., Lemon, S. M., Liang, T. J., & Hoofnagle, J. H. (2008). Mechanisms of action of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: Summary of a workshop. *Hepatology*, 47(1), 306-320.

- Clarke, A., & Kulasegaram, R. (2006). Hepatitis C transmission -- where are we now? *Int J STD AIDS*, 17(2), 74-80; quiz 80.
- Clemens, M. J. (2003). Interferons and apoptosis. *J Interferon Cytokine Res*, 23(6), 277-292.
- Colonna, M., Trinchieri, G., & Liu, Y. J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*, 5(12), 1219-1226.
- Cook, D. N., Pisetsky, D. S., & Schwartz, D. A. (2004). Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol*, 5(10), 975-979.
- Cooper, S., Erickson, A. L., Adams, E. J., Kansopon, J., Weiner, A. J., Chien, D. Y., et al. (1999). Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*, 10(4), 439-449.
- Courageot, M. P., Catteau, A., & Despres, P. (2003). Mechanisms of dengue virus-induced cell death. *Adv Virus Res*, 60, 157-186.
- Crispe, I. N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol*, 27, 147-163.
- Cui, S., Eisenacher, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., et al. (2008). The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell*, 29(2), 169-179.
- Cusson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T. H., Fitzgerald, K. A., & Kelliher, M. A. (2005). Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem*, 280(44), 36560-36566.
- Damm, E. M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., & Helenius, A. (2005). Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol*, 168(3), 477-488.
- Dansako, H., Ikeda, M., Ariumi, Y., Wakita, T., & Kato, N. (2009). Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch Virol*.
- Danta, M., Brown, D., Bhagani, S., Pybus, O. G., Sabin, C. A., Nelson, M., et al. (2007). Recent epidemic of acute hepatitis C virus in HIV-positive men who have sex with men linked to high-risk sexual behaviours. *AIDS*, 21(8), 983-991.
- Date, T., Kato, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Yasui, K., Mizokami, M., et al. (2004). Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem*, 279(21), 22371-22376.
- de Bouteiller, O., Merck, E., Hasan, U. A., Hubac, S., Benguigui, B., Trinchieri, G., et al. (2005). Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. *J Biol Chem*, 280(46), 38133-38145.
- De Creus, A., Abe, M., Lau, A. H., Hackstein, H., Raimondi, G., & Thomson, A. W. (2005). Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin. *J Immunol*, 174(4), 2037-2045.
- De Francesco, R., & Migliaccio, G. (2005). Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature*, 436(7053), 953-960.
- de Lucas, S., Bartolome, J., & Carreno, V. (2005). Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *J Infect Dis*, 191(1), 93-99.
- De Smet, K., Loyer, P., Gilot, D., Vercruyse, A., Rogiers, V., & Guguen-Guillouzo, C. (2001). Effects of epidermal growth factor on CYP inducibility by xenobiotics, DNA replication, and caspase activations in collagen I gel sandwich cultures of rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 61(10), 1293-1303.
- Decalf, J., Fernandes, S., Longman, R., Ahloulay, M., Audat, F., Lefrerre, F., et al. (2007). Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. *J Exp Med*, 204(10), 2423-2437.

- Deforges, S., Evlashev, A., Perret, M., Sodoyer, M., Pouzol, S., Scoazec, J. Y., et al. (2004). Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J Gen Virol*, 85(Pt 9), 2515-2523.
- Deltenre, P., Henrion, J., Canva, V., Dharancy, S., Texier, F., Louvet, A., et al. (2004). Evaluation of amantadine in chronic hepatitis C: a meta-analysis. *J Hepatol*, 41(3), 462-473.
- Demers, G. W., Sugarman, B. J., Beltran, J. C., Westreich, L. N., Ahmed, C. M., Lau, J. Y., et al. (2002). Interferon-alpha2b secretion by adenovirus-mediated gene delivery in rat, rabbit, and chimpanzee results in similar pharmacokinetic profiles. *Toxicol Appl Pharmacol*, 180(1), 36-42.
- Der, S. D., & Lau, A. S. (1995). Involvement of the double-stranded-RNA-dependent kinase PKR in interferon expression and interferon-mediated antiviral activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(19), 8841-8845.
- Deuffic-Burban, S., Poynard, T., Sulkowski, M. S., & Wong, J. B. (2007). Estimating the future health burden of chronic hepatitis C and human immunodeficiency virus infections in the United States. *J Viral Hepat*, 14(2), 107-115.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., & Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303(5663), 1529-1531.
- Diebold, S. S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L. E., et al. (2003). Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature*, 424(6946), 324-328.
- DiPerna, G., Stack, J., Bowie, A. G., Boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., et al. (2004). Poxvirus protein NIL targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J Biol Chem*, 279(35), 36570-36578.
- Dolganic, A., Oak, S., Kodys, K., Golenbock, D. T., Finberg, R. W., Kurt-Jones, E., et al. (2004). Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology*, 127(5), 1513-1524.
- Doyle, S. E., Schreckhise, H., Khuu-Duong, K., Henderson, K., Rosler, R., Storey, H., et al. (2006). Interleukin-29 uses a type 1 interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes. *Hepatology*, 44(4), 896-906.
- Dreux, M., Pietschmann, T., Granier, C., Voisset, C., Ricard-Blum, S., Mangeot, P. E., et al. (2006). High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem*, 281(27), 18285-18295.
- Dubuisson, J., Helle, F., & Cocquerel, L. (2008). Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol*, 10(4), 821-827.
- Dumoutier, L., Tounsi, A., Michiels, T., Sommereyns, C., Kotenko, S. V., & Renauld, J. C. (2004). Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J Biol Chem*, 279(31), 32269-32274.
- Durantel, D., & Zoulim, F. (2007). Going towards more relevant cell culture models to study the in vitro replication of serum-derived hepatitis C virus and virus/host cell interactions? *J Hepatol*, 46(1), 1-5.
- Ebihara, T., Shingai, M., Matsumoto, M., Wakita, T., & Seya, T. (2008). Hepatitis C virus-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology*, 48(1), 48-58.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., et al. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*, 76(12), 5974-5984.

- Einav, S., Gerber, D., Bryson, P. D., Sklan, E. H., Elazar, M., Maerkl, S. J., et al. (2008). Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nat Biotechnol*, 26(9), 1019-1027.
- Ejrnaes, M., Filippi, C. M., Martinic, M. M., Ling, E. M., Togher, L. M., Crotty, S., et al. (2006). Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Med*, 203(11), 2461-2472.
- Elazar, M., Cheong, K. H., Liu, P., Greenberg, H. B., Rice, C. M., & Glenn, J. S. (2003). Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, 77(10), 6055-6061.
- Elazar, M., Liu, P., Rice, C. M., & Glenn, J. S. (2004). An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol*, 78(20), 11393-11400.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), 494-498.
- Evans, M. J., Rice, C. M., & 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), 13038-13043.
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tschernie, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., et al. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446(7137), 801-805.
- Failla, C., Tomei, L., & De Francesco, R. (1994). Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol*, 68(6), 3753-3760.
- Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J. C., et al. (2000). The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*, 288(5464), 339-344.
- Farrar, M. A., & Schreiber, R. D. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*, 11, 571-611.
- Feld, J. J., & Hoofnagle, J. H. (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, 436(7053), 967-972.
- Feld, J. J., Nanda, S., Huang, Y., Chen, W., Cam, M., Pusek, S. N., et al. (2007). Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology*, 46(5), 1548-1563.
- Ferrantini, M., Capone, I., & Belardelli, F. (2007). Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie*, 89(6-7), 884-893.
- Ferreon, J. C., Ferreon, A. C., Li, K., & Lemon, S. M. (2005). Molecular determinants of TRIF proteolysis mediated by the hepatitis C virus NS3/4A protease. *J Biol Chem*, 280(21), 20483-20492.
- Fish, R. J., & Kruihof, E. K. (2004). Short-term cytotoxic effects and long-term instability of RNAi delivered using lentiviral vectors. *BMC Mol Biol*, 5, 9.
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., et al. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*, 4(5), 491-496.
- Flanegan, J. B., Petterson, R. F., Ambros, V., Hewlett, N. J., & Baltimore, D. (1977). Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(3), 961-965.
- Ford, E., & Thanos, D. (2010). The transcriptional code of human IFN-beta gene expression. *Biochim Biophys Acta*, 1799(3-4), 328-336.
- Forton, D. M., Karayiannis, P., Mahmud, N., Taylor-Robinson, S. D., & Thomas, H. C. (2004). Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and

- comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol*, 78(10), 5170-5183.
- Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, G., Larrey, D., et al. (1998). In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol*, 79 (Pt 10), 2367-2374.
- Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Johnson, C. L., Wang, C., et al. (2005). Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(8), 2986-2991.
- Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Ikeda, M., Lemon, S. M., et al. (2003). Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*, 300(5622), 1145-1148.
- Francois, C., Duverlie, G., Rebouillat, D., Khorsi, H., Castelain, S., Blum, H. E., et al. (2000). Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis. *J Virol*, 74(12), 5587-5596.
- Frank, C., Mohamed, M. K., Strickland, G. T., Lavanchy, D., Arthur, R. R., Magder, L. S., et al. (2000). The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*, 355(9207), 887-891.
- Freeman, A. J., Dore, G. J., Law, M. G., Thorpe, M., Von Overbeck, J., Lloyd, A. R., et al. (2001a). Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 34(4 Pt 1), 809-816.
- Freeman, A. J., Marinos, G., Ffrench, R. A., & Lloyd, A. R. (2001b). Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol*, 79(6), 515-536.
- Friebe, P., & Bartenschlager, R. (2002). Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol*, 76(11), 5326-5338.
- Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J. P., & Bartenschlager, R. (2005). Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol*, 79(1), 380-392.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., & Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol*, 75(24), 12047-12057.
- Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F. L., Jr., et al. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 347(13), 975-982.
- Friedman, C. S., O'Donnell, M. A., Legarda-Addison, D., Ng, A., Cardenas, W. B., Yount, J. S., et al. (2008). The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO Rep*, 9(9), 930-936.
- Fujii, Y., Shimizu, T., Kusumoto, M., Kyogoku, Y., Taniguchi, T., & Hakoshima, T. (1999). Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *EMBO J*, 18(18), 5028-5041.
- Funami, K., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Akazawa, T., Yamamoto, A., & Seya, T. (2004). The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int Immunol*, 16(8), 1143-1154.
- Gack, M. U., Kirchhofer, A., Shin, Y. C., Inn, K. S., Liang, C., Cui, S., et al. (2008). Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(43), 16743-16748.
- Gack, M. U., Shin, Y. C., Joo, C. H., Urano, T., Liang, C., Sun, L., et al. (2007). TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*, 446(7138), 916-920.
- Gale, M., Jr., Blakely, C. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Tang, N. M., et al. (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol*, 18(9), 5208-5218.

- Galun, E., Terrault, N. A., Eren, R., Zauberman, A., Nussbaum, O., Terkieltaub, D., et al. (2007). Clinical evaluation (Phase I) of a human monoclonal antibody against hepatitis C virus: safety and antiviral activity. *J Hepatol*, *46*(1), 37-44.
- Gardner, J. P., Durso, R. J., Arrigale, R. R., Donovan, G. P., Maddon, P. J., Dragic, T., et al. (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(8), 4498-4503.
- Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., & Chisari, F. V. (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol*, *82*(5), 2120-2129.
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., et al. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, *461*(7262), 399-401.
- Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Jung, M. C., Gruener, N. H., Schraut, W. W., Zachoval, R., et al. (1999). Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, *117*(4), 933-941.
- Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Zachoval, R., Gruener, N. H., Jung, M. C., Ulsenheimer, A., et al. (2003). Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology*, *125*(1), 80-88.
- Ghosh, S., & Hayden, M. S. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol*, *8*(11), 837-848.
- Giannakopoulos, N. V., Luo, J. K., Papov, V., Zou, W., Lenschow, D. J., Jacobs, B. S., et al. (2005). Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *336*(2), 496-506.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, *25*(51), 6680-6684.
- Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., et al. (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(22), 8459-8464.
- Gohda, J., Matsumura, T., & Inoue, J. (2004). Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J Immunol*, *173*(5), 2913-2917.
- Gondai, T., Yamaguchi, K., Miyano-Kurosaki, N., Habu, Y., & Takaku, H. (2008). Short-hairpin RNAs synthesized by T7 phage polymerase do not induce interferon. *Nucleic Acids Res*, *36*(3), e18.
- Gondois-Rey, F., Dental, C., Halfon, P., Baumert, T. F., Olive, D., & Hirsch, I. (2009). Hepatitis C virus is a weak inducer of interferon alpha in plasmacytoid dendritic cells in comparison with influenza and human herpesvirus type-1. *PLoS One*, *4*(2), e4319.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., et al. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol*, *77*(9), 5487-5492.
- Graff, J. W., Mitzel, D. N., Weisend, C. M., Flenniken, M. L., & Hardy, M. E. (2002). Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *J Virol*, *76*(18), 9545-9550.
- Graham, S. C., Bahar, M. W., Cooray, S., Chen, R. A., Whalen, D. M., Abrescia, N. G., et al. (2008). Vaccinia virus proteins A52 and B14 Share a Bcl-2-like fold but have evolved to inhibit NF-kappaB rather than apoptosis. *PLoS Pathog*, *4*(8), e1000128.
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., & Rice, C. M. (1993). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(22), 10583-10587.
- Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., et al. (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), 34-38.

- Grobler, J. A., Markel, E. J., Fay, J. F., Graham, D. J., Simcoe, A. L., Ludmerer, S. W., et al. (2003). Identification of a key determinant of hepatitis C virus cell culture adaptation in domain II of NS3 helicase. *J Biol Chem*, 278(19), 16741-16746.
- Gu, B., Gates, A. T., Isken, O., Behrens, S. E., & Sarisky, R. T. (2003). Replication studies using genotype 1a subgenomic hepatitis C virus replicons. *J Virol*, 77(9), 5352-5359.
- Guerra, S., Caceres, A., Knobeloch, K. P., Horak, I., & Esteban, M. (2008). Vaccinia virus E3 protein prevents the antiviral action of ISG15. *PLoS Pathog*, 4(7), e1000096.
- Guo, J., Hui, D. J., Merrick, W. C., & Sen, G. C. (2000). A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *EMBO J*, 19(24), 6891-6899.
- Guo, J. T., Bichko, V. V., & Seeger, C. (2001). Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol*, 75(18), 8516-8523.
- Guzylack-Piriou, L., Bergamin, F., Gerber, M., McCullough, K. C., & Summerfield, A. (2006). Plasmacytoid dendritic cell activation by foot-and-mouth disease virus requires immune complexes. *Eur J Immunol*, 36(7), 1674-1683.
- Gyory, I., Wu, J., Fejer, G., Seto, E., & Wright, K. L. (2004). PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nat Immunol*, 5(3), 299-308.
- Haasnoot, J., de Vries, W., Geutjes, E. J., Prins, M., de Haan, P., & Berkhout, B. (2007). The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog*, 3(6), e86.
- Habjan, M., Andersson, I., Klingstrom, J., Schumann, M., Martin, A., Zimmermann, P., et al. (2008). Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS One*, 3(4), e2032.
- Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L. C., Wang, G. G., et al. (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*, 439(7073), 204-207.
- Hamamoto, S., Uchida, Y., Wada, T., Moritani, M., Sato, S., Hamamoto, N., et al. (2005). Changes in serum lipid concentrations in patients with chronic hepatitis C virus positive hepatitis responsive or non-responsive to interferon therapy. *J Gastroenterol Hepatol*, 20(2), 204-208.
- Han, K. J., Su, X., Xu, L. G., Bin, L. H., Zhang, J., & Shu, H. B. (2004). Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem*, 279(15), 15652-15661.
- Hang, J. Q., Yang, Y., Harris, S. F., Leveque, V., Whittington, H. J., Rajyaguru, S., et al. (2009). Slow binding inhibition and mechanism of resistance of non-nucleoside polymerase inhibitors of hepatitis C virus. *J Biol Chem*, 284(23), 15517-15529.
- Harada, K., Isse, K., & Nakanuma, Y. (2006a). Interferon gamma accelerates NF-kappaB activation of biliary epithelial cells induced by Toll-like receptor and ligand interaction. *J Clin Pathol*, 59(2), 184-190.
- Harada, K., Isse, K., Sato, Y., Ozaki, S., & Nakanuma, Y. (2006b). Endotoxin tolerance in human intrahepatic biliary epithelial cells is induced by upregulation of IRAK-M. *Liver Int*, 26(8), 935-942.
- Harris, J., Olieri, S., Sharma, S., Sun, Q., Lin, R., Hiscott, J., et al. (2006). Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK epsilon. *J Immunol*, 177(4), 2527-2535.
- Harte, M. T., Haga, I. R., Maloney, G., Gray, P., Reading, P. C., Bartlett, N. W., et al. (2003). The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med*, 197(3), 343-351.
- Hayashi, N., Higashi, H., Kaminaka, K., Sugimoto, H., Esumi, M., Komatsu, K., et al. (1993). Molecular cloning and heterogeneity of the human hepatitis C virus (HCV) genome. *J Hepatol*, 17 Suppl 3, S94-107.
- Hayden, M. S., West, A. P., & Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*, 25(51), 6758-6780.



- He, X. S., Rehermann, B., Lopez-Labrador, F. X., Boisvert, J., Cheung, R., Mumm, J., et al. (1999). Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(10), 5692-5697.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., et al. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, *303*(5663), 1526-1529.
- Heim, M. H., Moradpour, D., & Blum, H. E. (1999). Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. *J Virol*, *73*(10), 8469-8475.
- Helbig, K. J., Lau, D. T., Semendric, L., Harley, H. A., & Beard, M. R. (2005). Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology*, *42*(3), 702-710.
- Helle, F., & Dubuisson, J. (2008). Hepatitis C virus entry into host cells. *Cell Mol Life Sci*, *65*(1), 100-112.
- Helle, F., Wychowski, C., Vu-Dac, N., Gustafson, K. R., Voisset, C., & Dubuisson, J. (2006). Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J Biol Chem*, *281*(35), 25177-25183.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., et al. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*, *3*(2), 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, *408*(6813), 740-745.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., et al. (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med*, *199*(12), 1641-1650.
- Henke, J. I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, C. G., Fehr, C., et al. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J*, *27*(24), 3300-3310.
- Hezode, C., Forestier, N., Dusheiko, G., Ferenci, P., Pol, S., Goeser, T., et al. (2009). Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med*, *360*(18), 1839-1850.
- Higgs, R., Ni Gabhann, J., Ben Larbi, N., Breen, E. P., Fitzgerald, K. A., & Jefferies, C. A. (2008). The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN-beta production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3. *J Immunol*, *181*(3), 1780-1786.
- Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., & Shimotohno, K. (1991). Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(13), 5547-5551.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., et al. (1993). Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol*, *67*(8), 4665-4675.
- Hiscott, J. (2007). Convergence of the NF-kappaB and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response. *Cytokine Growth Factor Rev*, *18*(5-6), 483-490.
- Hiscott, J., Nguyen, T. L., Arguello, M., Nakhaei, P., & Paz, S. (2006). Manipulation of the nuclear factor-kappaB pathway and the innate immune response by viruses. *Oncogene*, *25*(51), 6844-6867.
- Hoffmann, A., Natoli, G., & Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*, *25*(51), 6706-6716.
- Honda, K., Sakaguchi, S., Nakajima, C., Watanabe, A., Yanai, H., Matsumoto, M., et al. (2003). Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(19), 10872-10877.
- Honda, K., Takaoka, A., & Taniguchi, T. (2006). Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*, *25*(3), 349-360.

- Honda, K., & Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*, 6(9), 644-658.
- Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, H., Shimada, N., Suzuki, N., et al. (2004). Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(43), 15416-15421.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., et al. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, 434(7034), 772-777.
- Honda, M., Kaneko, S., Matsushita, E., Kobayashi, K., Abell, G. A., & Lemon, S. M. (2000). Cell cycle regulation of hepatitis C virus internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology*, 118(1), 152-162.
- Hoofnagle, J. H. (2002). Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, 36(5 Suppl 1), S21-29.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., et al. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, 314(5801), 994-997.
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., et al. (2005). Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med*, 11(3), 263-270.
- Hornung, V., Schlender, J., Guenther-Biller, M., Rothenfusser, S., Endres, S., Conzelmann, K. K., et al. (2004). Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J Immunol*, 173(10), 5935-5943.
- Horsmans, Y., Berg, T., Desager, J. P., Mueller, T., Schott, E., Fletcher, S. P., et al. (2005). Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology*, 42(3), 724-731.
- Hsu, E. C., Hsi, B., Hirota-Tsuchihara, M., Ruland, J., Iorio, C., Sarangi, F., et al. (2003). Modified apoptotic molecule (BID) reduces hepatitis C virus infection in mice with chimeric human livers. *Nat Biotechnol*, 21(5), 519-525.
- Hsu, I. C., Tokiwa, T., Bennett, W., Metcalf, R. A., Welsh, J. A., Sun, T., et al. (1993). p53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 14(5), 987-992.
- Huang, H., Sun, F., Owen, D. M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr., et al. (2007a). 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), 5848-5853.
- Huang, J., Liu, T., Xu, L. G., Chen, D., Zhai, Z., & Shu, H. B. (2005). SIKE is an IKK epsilon/TBK1-associated suppressor of TLR3- and virus-triggered IRF-3 activation pathways. *EMBO J*, 24(23), 4018-4028.
- Huang, Y., Feld, J. J., Sapp, R. K., Nanda, S., Lin, J. H., Blatt, L. M., et al. (2007b). Defective hepatic response to interferon and activation of suppressor of cytokine signaling 3 in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 132(2), 733-744.
- Huang, Y., Staschke, K., De Francesco, R., & Tan, S. L. (2007c). Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology*, 364(1), 1-9.
- Huang, Z., Murray, M. G., & Secrist, J. A., 3rd. (2006). Recent development of therapeutics for chronic HCV infection. *Antiviral Res*, 71(2-3), 351-362.
- Hui, D. J., Bhasker, C. R., Merrick, W. C., & Sen, G. C. (2003). Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2.GTP.Met-tRNAi. *J Biol Chem*, 278(41), 39477-39482.
- Hutchens, M., Luker, K. E., Sottile, P., Sonstein, J., Lukacs, N. W., Nunez, G., et al. (2008). TLR3 increases disease morbidity and mortality from vaccinia infection. *J Immunol*, 180(1), 483-491.

- Iacovacci, S., Manzin, A., Barca, S., Sargiacomo, M., Serafino, A., Valli, M. B., et al. (1997). Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. *Hepatology*, *26*(5), 1328-1337.
- Ikeda, M., Yi, M., Li, K., & Lemon, S. M. (2002). Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol*, *76*(6), 2997-3006.
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, *147*(927), 258-267.
- Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., et al. (2006). A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol*, *7*(1), 40-48.
- Ishii, S., & Koziel, M. J. (2008). Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clin Immunol*, *128*(2), 133-147.
- Ishikawa, H., & Barber, G. N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, *455*(7213), 674-678.
- Ito, T., Tahara, S. M., & Lai, M. M. (1998). The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol*, *72*(11), 8789-8796.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, *5*(10), 987-995.
- Jacobs, B. L., & Langland, J. O. (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*, *219*(2), 339-349.
- Jacobs, J. M., Diamond, D. L., Chan, E. Y., Gritsenko, M. A., Qian, W., Stasna, M., et al. (2005). Proteome analysis of liver cells expressing a full-length hepatitis C virus (HCV) replicon and biopsy specimens of posttransplantation liver from HCV-infected patients. *J Virol*, *79*(12), 7558-7569.
- Janssens, S., Burns, K., Tschopp, J., & Beyaert, R. (2002). Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol*, *12*(6), 467-471.
- Jiang, Z. Y., He, Z., King, B. L., Kuroki, T., Opland, D. M., Suzuma, K., et al. (2003). Characterization of multiple signaling pathways of insulin in the regulation of vascular endothelial growth factor expression in vascular cells and angiogenesis. *J Biol Chem*, *278*(34), 31964-31971.
- Jin, L., Waterman, P. M., Jonscher, K. R., Short, C. M., Reisdorph, N. A., & Cambier, J. C. (2008). MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Mol Cell Biol*, *28*(16), 5014-5026.
- Jin, M. S., & Lee, J. O. (2008). Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*, *29*(2), 182-191.
- Johnsen, I. B., Nguyen, T. T., Ringdal, M., Tryggestad, A. M., Bakke, O., Lien, E., et al. (2006). Toll-like receptor 3 associates with c-Src tyrosine kinase on endosomes to initiate antiviral signaling. *EMBO J*, *25*(14), 3335-3346.
- Jones, C. T., Murray, C. L., Eastman, D. K., Tassello, J., & Rice, C. M. (2007). Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol*, *81*(16), 8374-8383.
- Jones, S. M., Howell, K. E., Henley, J. R., Cao, H., & McNiven, M. A. (1998). Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science*, *279*(5350), 573-577.
- Jopling, C. L., Schutz, S., & Sarnow, P. (2008). Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe*, *4*(1), 77-85.

- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M., & Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, *309*(5740), 1577-1581.
- Jouan, L., Melancon, P., Rodrigue-Gervais, I. G., Raymond, V. A., Selliah, S., Boucher, G., et al. (2009). Distinct antiviral signaling pathways in primary human hepatocytes and their differential disruption by HCV NS3 protease. *J Hepatol*.
- Kaiser, W. J., & Offermann, M. K. (2005). Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol*, *174*(8), 4942-4952.
- Kanda, T., Steele, R., Ray, R., & Ray, R. B. (2007). Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *J Virol*, *81*(2), 669-676.
- Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Asabe, S., Kimura, K., et al. (1994). Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun*, *205*(1), 320-326.
- Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A. M., & Fisher, P. B. (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(2), 637-642.
- Kanto, T., & Hayashi, N. (2006). Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med*, *45*(4), 183-191.
- Kanto, T., Inoue, M., Miyatake, H., Sato, A., Sakakibara, M., Yakushijin, T., et al. (2004). Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*, *190*(11), 1919-1926.
- Kapadia, S. B., & 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), 2561-2566.
- Kaplan, D. E., Sugimoto, K., Newton, K., Valiga, M. E., Ikeda, F., Aytaman, A., et al. (2007). Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology*, *132*(2), 654-666.
- Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J., & Weissman, D. (2004). Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol*, *172*(11), 6545-6549.
- Karin, M., & Greten, F. R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, *5*(10), 749-759.
- Kash, J. C., Muhlberger, E., Carter, V., Grosch, M., Perwitasari, O., Proll, S. C., et al. (2006). Global suppression of the host antiviral response by Ebola- and Marburgviruses: increased antagonism of the type I interferon response is associated with enhanced virulence. *J Virol*, *80*(6), 3009-3020.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., et al. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*, *205*(7), 1601-1610.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, *441*(7089), 101-105.
- Kato, N., Sugiyama, K., Namba, K., Dansako, H., Nakamura, T., Takami, M., et al. (2003a). Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, *306*(3), 756-766.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., et al. (2003b). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, *125*(6), 1808-1817.

- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Mizokami, M., & 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), 592-596.
- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., et al. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol*, *64*(3), 334-339.
- Katze, M. G., He, Y., & Gale, M., Jr. (2002). Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol*, *2*(9), 675-687.
- Kawai, T., & Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*, *13*(11), 460-469.
- Kawai, T., & Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci*, *1143*, 1-20.
- Kawai, T., Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., et al. (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol*, *5*(10), 1061-1068.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., et al. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*, *6*(10), 981-988.
- Kayagaki, N., Phung, Q., Chan, S., Chaudhari, R., Quan, C., O'Rourke, K. M., et al. (2007). DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science*, *318*(5856), 1628-1632.
- Khvalevsky, E., Rivkin, L., Rachmilewitz, J., Galun, E., & Giladi, H. (2007). TLR3 signaling in a hepatoma cell line is skewed towards apoptosis. *J Cell Biochem*, *100*(5), 1301-1312.
- Kieffer, T. L., Sarrazin, C., Miller, J. S., Welker, M. W., Forestier, N., Reesink, H. W., et al. (2007). Telaprevir and pegylated interferon-alpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients. *Hepatology*, *46*(3), 631-639.
- Kim, T. K., & Maniatis, T. (1997). The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol Cell*, *1*(1), 119-129.
- Kim, T. W., Staschke, K., Bulek, K., Yao, J., Peters, K., Oh, K. H., et al. (2007). A critical role for IRAK4 kinase activity in Toll-like receptor-mediated innate immunity. *J Exp Med*, *204*(5), 1025-1036.
- Kishine, H., Sugiyama, K., Hijikata, M., Kato, N., Takahashi, H., Noshi, T., et al. (2002). Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun*, *293*(3), 993-999.
- Kleinman, M. E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J. Z., et al. (2008). Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*, *452*(7187), 591-597.
- Knolle, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., Meyer zum Buschenfelde, K. H., & Gerken, G. (1995). Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol*, *22*(2), 226-229.
- Koch, J. O., & Bartenschlager, R. (1999). Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol*, *73*(9), 7138-7146.
- Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M., & Rice, C. M. (1997). Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, *277*(5325), 570-574.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M., & 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), 3363-3371.
- Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M., & Rice, C. M. (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol*, *74*(4), 2046-2051.

- Komuro, A., Bamming, D., & Horvath, C. M. (2008). Negative regulation of cytoplasmic RNA-mediated antiviral signaling. *Cytokine*, *43*(3), 350-358.
- Komuro, A., & Horvath, C. M. (2006). RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *J Virol*, *80*(24), 12332-12342.
- Kopydlowski, K. M., Salkowski, C. A., Cody, M. J., van Rooijen, N., Major, J., Hamilton, T. A., et al. (1999). Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol*, *163*(3), 1537-1544.
- Kost, D. P., & Michalopoulos, G. K. (1991). Effect of 2% dimethyl sulfoxide on the mitogenic properties of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor in primary hepatocyte culture. *J Cell Physiol*, *147*(2), 274-280.
- Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., et al. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, *4*(1), 69-77.
- Kotenko, S. V., & Langer, J. A. (2004). Full house: 12 receptors for 27 cytokines. *Int Immunopharmacol*, *4*(5), 593-608.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T., et al. (2006). Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol*, *80*(11), 5308-5320.
- Kroemer, G., & Jaattela, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer*, *5*(11), 886-897.
- Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A., Dzionek, A., Pingel, J. T., et al. (2004a). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity*, *21*(1), 107-119.
- Krug, A., Luker, G. D., Barchet, W., Leib, D. A., Akira, S., & Colonna, M. (2004b). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood*, *103*(4), 1433-1437.
- Kumar, A., Zhang, J., & Yu, F. S. (2006). Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells. *Immunology*, *117*(1), 11-21.
- Lace, M. J., Anson, J. R., Klingelutz, A. J., Harada, H., Taniguchi, T., Bossler, A. D., et al. (2009). Interferon-beta treatment increases human papillomavirus early gene transcription and viral plasmid genome replication by activating interferon regulatory factor (IRF)-1. *Carcinogenesis*, *30*(8), 1336-1344.
- Lam, A. M., & Frick, D. N. (2006). Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *J Virol*, *80*(1), 404-411.
- Lamarre, D., Anderson, P. C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P., et al. (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*, *426*(6963), 186-189.
- Lanford, R. E., Bigger, C., Bassett, S., & Klimpel, G. (2001). The chimpanzee model of hepatitis C virus infections. *ILAR J*, *42*(2), 117-126.
- Lanford, R. E., Evans, M. J., Lohmann, V., Lindenbach, B., Gale, M., Jr., Rehermann, B., et al. (2009). The accelerating pace of HCV research: a summary of the 15th International Symposium on Hepatitis C Virus And Related Viruses. *Gastroenterology*, *136*(1), 9-16.
- Lanford, R. E., Guerra, B., Bigger, C. B., Lee, H., Chavez, D., & Brasky, K. M. (2007). Lack of response to exogenous interferon-alpha in the liver of chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *Hepatology*, *46*(4), 999-1008.
- Lanford, R. E., Guerra, B., Lee, H., Averett, D. R., Pfeiffer, B., Chavez, D., et al. (2003). Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol*, *77*(2), 1092-1104.

- Lanford, R. E., Guerra, B., Lee, H., Chavez, D., Brasky, K. M., & Bigger, C. B. (2006). Genomic response to interferon-alpha in chimpanzees: implications of rapid downregulation for hepatitis C kinetics. *Hepatology*, *43*(5), 961-972.
- Laskus, T., Radkowski, M., Piasek, A., Nowicki, M., Horban, A., Cianciara, J., et al. (2000). Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis*, *181*(2), 442-448.
- Lau, D. T., Fish, P. M., Sinha, M., Owen, D. M., Lemon, S. M., & Gale, M., Jr. (2008). Interferon regulatory factor-3 activation, hepatic interferon-stimulated gene expression, and immune cell infiltration in hepatitis C virus patients. *Hepatology*, *47*(3), 799-809.
- Lau, J. Y., Xie, X., Lai, M. M., & Wu, P. C. (1998). Apoptosis and viral hepatitis. *Semin Liver Dis*, *18*(2), 169-176.
- Lazaro, C. A., Chang, M., Tang, W., Campbell, J., Sullivan, D. G., Gretch, D. R., et al. (2007). Hepatitis C virus replication in transfected and serum-infected cultured human fetal hepatocytes. *Am J Pathol*, *170*(2), 478-489.
- Le Bon, A., & Tough, D. F. (2002). Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol*, *14*(4), 432-436.
- Le Goffic, R., Balloy, V., Lagranderie, M., Alexopoulou, L., Escriou, N., Flavell, R., et al. (2006). Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog*, *2*(6), e53.
- Lechner, F., Wong, D. K., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., et al. (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med*, *191*(9), 1499-1512.
- Lederer, S. L., Walters, K. A., Proll, S., Paeper, B., Robinzon, S., Boix, L., et al. (2006). Distinct cellular responses differentiating alcohol- and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Virol J*, *3*, 98.
- Lee, G., Piper, D. E., Wang, Z., Anzola, J., Powers, J., Walker, N., et al. (2006a). Novel inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerases. *J Mol Biol*, *357*(4), 1051-1057.
- Lee, H., Shin, H., Wimmer, E., & Paul, A. V. (2004a). cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome. *J Virol*, *78*(20), 10865-10877.
- Lee, J., Shin, M. K., Lee, H. J., Yoon, G., & Ryu, W. S. (2004b). Three novel cis-acting elements required for efficient plus-strand DNA synthesis of the hepatitis B virus genome. *J Virol*, *78*(14), 7455-7464.
- Lee, J. Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Mace, D., Ohler, U., & Benfey, P. N. (2006b). Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in Arabidopsis roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(15), 6055-6060.
- Lee, Y. F., Nomoto, A., Detjen, B. M., & Wimmer, E. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *74*(1), 59-63.
- Lenschow, D. J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N. V., Lutz, A., Wolff, T., et al. (2007). IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(4), 1371-1376.
- Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F., & Weber, P. C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol*, *6*(10), 937-943.
- Li, K., Chen, Z., Kato, N., Gale, M., Jr., & 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), 16739-16747.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., et al. (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), 2992-2997.

- Li, X., Ranjith-Kumar, C. T., Brooks, M. T., Dharmiah, S., Herr, A. B., Kao, C., et al. (2009a). The RIG-I-like receptor LGP2 recognizes the termini of double-stranded RNA. *J Biol Chem*, 284(20), 13881-13891.
- Li, X. D., Sun, L., Seth, R. B., Pineda, G., & Chen, Z. J. (2005c). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(49), 17717-17722.
- Li, Y., Chang, M., Abar, O., Garcia, V., Rowland, C., Catanese, J., et al. (2009b). Multiple variants in toll-like receptor 4 gene modulate risk of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *J Hepatol*, 51(4), 750-757.
- Li, Y., Li, C., Xue, P., Zhong, B., Mao, A. P., Ran, Y., et al. (2009c). ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(19), 7945-7950.
- Liang, Y., Ishida, H., Lenz, O., Lin, T. I., Nyanguile, O., Simmen, K., et al. (2008). Antiviral suppression vs restoration of RIG-I signaling by hepatitis C protease and polymerase inhibitors. *Gastroenterology*, 135(5), 1710-1718 e1712.
- Lichtman, S. N., Wang, J., & Lemasters, J. J. (1998). LPS receptor CD14 participates in release of TNF-alpha in RAW 264.7 and peritoneal cells but not in kupffer cells. *Am J Physiol*, 275(1 Pt 1), G39-46.
- Lin, C., Pragai, B. M., Grakoui, A., Xu, J., & Rice, C. M. (1994). Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics. *J Virol*, 68(12), 8147-8157.
- Lin, C., Thomson, J. A., & Rice, C. M. (1995). A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J Virol*, 69(7), 4373-4380.
- Lin, K., Perni, R. B., Kwong, A. D., & Lin, C. (2006a). VX-950, a novel hepatitis C virus (HCV) NS3-4A protease inhibitor, exhibits potent antiviral activities in HCV replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(5), 1813-1822.
- Lin, R., Genin, P., Mamane, Y., Sgarbanti, M., Battistini, A., Harrington, W. J., Jr., et al. (2001). HHV-8 encoded vIRF-1 represses the interferon antiviral response by blocking IRF-3 recruitment of the CBP/p300 coactivators. *Oncogene*, 20(7), 800-811.
- Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P. M., & Hiscott, J. (1998). Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, 18(5), 2986-2996.
- Lin, R., Lacoste, J., Nakhaei, P., Sun, Q., Yang, L., Paz, S., et al. (2006b). Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J Virol*, 80(12), 6072-6083.
- Lin, R., Mamane, Y., & Hiscott, J. (2000). Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection. *J Biol Chem*, 275(44), 34320-34327.
- Lin, W., Choe, W. H., Hiasa, Y., Kamegaya, Y., Blackard, J. T., Schmidt, E. V., et al. (2005). Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology*, 128(4), 1034-1041.
- Lin, W., Kim, S. S., Yeung, E., Kamegaya, Y., Blackard, J. T., Kim, K. A., et al. (2006c). Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *J Virol*, 80(18), 9226-9235.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., et al. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 309(5734), 623-626.
- Lindenbach, B. D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A. J., McKeating, J. A., et al. (2006). Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(10), 3805-3809.



- Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., Montserret, R., Beran, R. K., Pyle, A. M., Penin, F., et al. (2007). The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol*, *81*(17), 8905-8918.
- Liu, B., Mink, S., Wong, K. A., Stein, N., Getman, C., Dempsey, P. W., et al. (2004). PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat Immunol*, *5*(9), 891-898.
- Liu, B., Yang, R., Wong, K. A., Getman, C., Stein, N., Teitell, M. A., et al. (2005). Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1. *Mol Cell Biol*, *25*(3), 1113-1123.
- Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J. N., Shiloach, J., Segal, D. M., et al. (2008). Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*, *320*(5874), 379-381.
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B., & Wang, T. (2009). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol*, *83*(4), 2011-2014.
- Liu, Y. J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*, *23*, 275-306.
- Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F., & Bartenschlager, R. (2003). Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol*, *77*(5), 3007-3019.
- Lohmann, V., Korner, F., Dobierzewska, A., & Bartenschlager, R. (2001). Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol*, *75*(3), 1437-1449.
- Loo, Y. M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., et al. (2008). Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol*, *82*(1), 335-345.
- Loo, Y. M., & Gale, M., Jr. (2007). Viral regulation and evasion of the host response. *Curr Top Microbiol Immunol*, *316*, 295-313.
- Loo, Y. M., Owen, D. M., Li, K., Erickson, A. K., Johnson, C. L., Fish, P. M., et al. (2006). Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(15), 6001-6006.
- Lorenz, I. C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T. G., & Rice, C. M. (2006). Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature*, *442*(7104), 831-835.
- Lu, G., Reinert, J. T., Pitha-Rowe, I., Okumura, A., Kellum, M., Knobloch, K. P., et al. (2006). ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, *52*(1), 29-41.
- Lu, L. L., Puri, M., Horvath, C. M., & Sen, G. C. (2008). Select paramyxoviral V proteins inhibit IRF3 activation by acting as alternative substrates for inhibitor of kappaB kinase epsilon (IKKe)/TBK1. *J Biol Chem*, *283*(21), 14269-14276.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., & Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*, *198*(3), 513-520.
- Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., et al. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(15), 5598-5603.
- Lundin, M., Monne, M., Widell, A., Von Heijne, G., & Persson, M. A. (2003). Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol*, *77*(9), 5428-5438.
- Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S. M., & Yi, M. (2008). NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol*, *82*(15), 7624-7639.
- Maher, S. G., Romero-Weaver, A. L., Scarzello, A. J., & Gamero, A. M. (2007). Interferon: cellular executioner or white knight? *Curr Med Chem*, *14*(12), 1279-1289.
- Majumder, S., Zhou, L. Z., Chaturvedi, P., Babcock, G., Aras, S., & Ransohoff, R. M. (1998). p48/STAT-1alpha-containing complexes play a predominant role in induction of IFN-gamma-inducible protein, 10 kDa (IP-10) by IFN-gamma alone or in synergy with TNF-alpha. *J Immunol*, *161*(9), 4736-4744.

- Malakhov, M. P., Kim, K. I., Malakhova, O. A., Jacobs, B. S., Borden, E. C., & Zhang, D. E. (2003). High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J Biol Chem*, 278(19), 16608-16613.
- Malakhova, O. A., Yan, M., Malakhov, M. P., Yuan, Y., Ritchie, K. J., Kim, K. I., et al. (2003). Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. *Genes Dev*, 17(4), 455-460.
- Mamane, Y., Heylbroeck, C., Genin, P., Algarte, M., Servant, M. J., LePage, C., et al. (1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene*, 237(1), 1-14.
- Mamiya, N., & Worman, H. J. (1999). Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J Biol Chem*, 274(22), 15751-15756.
- Manche, L., Green, S. R., Schmedt, C., & Mathews, M. B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol*, 12(11), 5238-5248.
- Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., et al. (2001). Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*, 358(9286), 958-965.
- Marcello, T., Grakoui, A., Barba-Spaeth, G., Machlin, E. S., Kotenko, S. V., MacDonald, M. R., et al. (2006). Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology*, 131(6), 1887-1898.
- Marie, I., Durbin, J. E., & Levy, D. E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J*, 17(22), 6660-6669.
- Marshall, A., Rushbrook, S., Davies, S. E., Morris, L. S., Scott, I. S., Vowler, S. L., et al. (2005). Relation between hepatocyte G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 128(1), 33-42.
- Martin-Armas, M., Simon-Santamaria, J., Pettersen, I., Moens, U., Smedsrod, B., & Sveinbjornsson, B. (2006). Toll-like receptor 9 (TLR9) is present in murine liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and mediates the effect of CpG-oligonucleotides. *J Hepatol*, 44(5), 939-946.
- Mathison, J. C., & Ulevitch, R. J. (1979). The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol*, 123(5), 2133-2143.
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., et al. (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*, 171(6), 3154-3162.
- Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K., & Seya, T. (2002). Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 293(5), 1364-1369.
- Matsumoto, M., & Seya, T. (2008). TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev*, 60(7), 805-812.
- Matsumura, T., Degawa, T., Takii, T., Hayashi, H., Okamoto, T., Inoue, J., et al. (2003). TRAF6-NF-kappaB pathway is essential for interleukin-1-induced TLR2 expression and its functional response to TLR2 ligand in murine hepatocytes. *Immunology*, 109(1), 127-136.
- Matsumura, T., Ito, A., Takii, T., Hayashi, H., & Onozaki, K. (2000). Endotoxin and cytokine regulation of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 gene expression in murine liver and hepatocytes. *J Interferon Cytokine Res*, 20(10), 915-921.
- Matsuyama, T., Kimura, T., Kitagawa, M., Pfeffer, K., Kawakami, T., Watanabe, N., et al. (1993). Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. *Cell*, 75(1), 83-97.
- Mattioli, I., Geng, H., Sebald, A., Hodel, M., Bucher, C., Kracht, M., et al. (2006). Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon. *J Biol Chem*, 281(10), 6175-6183.

- McHutchison, J. G., Bacon, B. R., Gordon, S. C., Lawitz, E., Shiffman, M., Afdhal, N. H., et al. (2007). Phase 1B, randomized, double-blind, dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus. *Hepatology*, *46*(5), 1341-1349.
- McHutchison, J. G., Manns, M. P., Muir, A. J., Terrault, N. A., Jacobson, I. M., Afdhal, N. H., et al. (2010). Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. *N Engl J Med*, *362*(14), 1292-1303.
- McHutchison, J. G., Patel, K., Pockros, P., Nyberg, L., Pianko, S., Yu, R. Z., et al. (2006). A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*, *44*(1), 88-96.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G., & Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J*, *21*(15), 3980-3988.
- McWhirter, S. M., Fitzgerald, K. A., Rosains, J., Rowe, D. C., Golenbock, D. T., & Maniatis, T. (2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(1), 233-238.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, *449*(7164), 819-826.
- Medzhitov, R., & Janeway, C., Jr. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med*, *343*(5), 338-344.
- Melen, K., Fagerlund, R., Nyqvist, M., Keskinen, P., & Julkunen, I. (2004). Expression of hepatitis C virus core protein inhibits interferon-induced nuclear import of STATs. *J Med Virol*, *73*(4), 536-547.
- Melroe, G. T., Silva, L., Schaffer, P. A., & Knipe, D. M. (2007). Recruitment of activated IRF-3 and CBP/p300 to herpes simplex virus ICP0 nuclear foci: Potential role in blocking IFN-beta induction. *Virology*, *360*(2), 305-321.
- Mencin, A., Kluwe, J., & Schwabe, R. F. (2009). Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut*, *58*(5), 704-720.
- Mengshol, J. A., Golden-Mason, L., & Rosen, H. R. (2007). Mechanisms of Disease: HCV-induced liver injury. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, *4*(11), 622-634.
- Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., et al. (2001). Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med*, *7*(8), 927-933.
- Meuleman, P., & Leroux-Roels, G. (2008). The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV. *Antiviral Res*, *80*(3), 231-238.
- Meuleman, P., Libbrecht, L., De Vos, R., de Hemptinne, B., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., et al. (2005). Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology*, *41*(4), 847-856.
- Meunier, J. C., Russell, R. S., Engle, R. E., Faulk, K. N., Purcell, R. H., & Emerson, S. U. (2008). Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus. *J Virol*, *82*(19), 9647-9656.
- Meurs, E., Krause, D., Robert, N., Silverman, R. H., & Hovanessian, A. G. (1985). The 2-5A system in control and interferon-treated K/BALB cells infected with encephalomyocarditis virus. *Prog Clin Biol Res*, *202*, 307-315.
- Meurs, E. F., Watanabe, Y., Kadereit, S., Barber, G. N., Katze, M. G., Chong, K., et al. (1992). Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. *J Virol*, *66*(10), 5805-5814.
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., et al. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*, *5*(5), 503-507.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., et al. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, *437*(7062), 1167-1172.

- Mibayashi, M., Martinez-Sobrido, L., Loo, Y. M., Cardenas, W. B., Gale, M., Jr., & Garcia-Sastre, A. (2007). Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol*, *81*(2), 514-524.
- Micallef, J. M., Kaldor, J. M., & Dore, G. J. (2006). Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat*, *13*(1), 34-41.
- Michallet, M. C., Meylan, E., Ermolaeva, M. A., Vazquez, J., Rebsamen, M., Curran, J., et al. (2008). TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity*, *28*(5), 651-661.
- Miller, D. M., Klucher, K. M., Freeman, J. A., Hausman, D. F., Fontana, D., & Williams, D. E. (2009). Interferon lambda as a potential new therapeutic for hepatitis C. *Ann N Y Acad Sci*, *1182*, 80-87.
- Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., et al. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell*, *54*(6), 903-913.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., et al. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*, *9*(9), 1089-1097.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, *22*(2), 240-273.
- Molina, S., Castet, V., Fournier-Wirth, C., Pichard-Garcia, L., Avner, R., Harats, D., et al. (2007). The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol*, *46*(3), 411-419.
- Molina, S., Castet, V., Pichard-Garcia, L., Wychowski, C., Meurs, E., Pascussi, J. M., et al. (2008). Serum-derived hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes is tetraspanin CD81 dependent. *J Virol*, *82*(1), 569-574.
- Moore, C. B., Bergstralh, D. T., Duncan, J. A., Lei, Y., Morrison, T. E., Zimmermann, A. G., et al. (2008). NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature*, *451*(7178), 573-577.
- Moradpour, D., Brass, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H. E., et al. (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, *78*(23), 13278-13284.
- Moradpour, D., Englert, C., Wakita, T., & Wands, J. R. (1996). Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology*, *222*(1), 51-63.
- Moradpour, D., Penin, F., & Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*, *5*(6), 453-463.
- Mosca, J. D., Pitha, P. M., & Hayward, G. S. (1992). Herpes simplex virus infection selectively stimulates accumulation of beta interferon reporter gene mRNA by a posttranscriptional mechanism. *J Virol*, *66*(6), 3811-3822.
- Mundt, B., Wirth, T., Zender, L., Waltemathe, M., Trautwein, C., Manns, M. P., et al. (2005). Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces hepatic steatosis in viral hepatitis and after alcohol intake. *Gut*, *54*(11), 1590-1596.
- Murakami, K., Ishii, K., Ishihara, Y., Yoshizaki, S., Tanaka, K., Gotoh, Y., et al. (2006). Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology*, *351*(2), 381-392.
- Murray, E. M., Grobler, J. A., Markel, E. J., Pagnoni, M. F., Paonessa, G., Simon, A. J., et al. (2003). Persistent replication of hepatitis C virus replicons expressing the beta-lactamase reporter in subpopulations of highly permissive Huh7 cells. *J Virol*, *77*(5), 2928-2935.

- Myong, S., Cui, S., Cornish, P. V., Kirchhofer, A., Gack, M. U., Jung, J. U., et al. (2009). Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science*, 323(5917), 1070-1074.
- Nakagawa, M., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Kanazawa, N., Koyama, T., et al. (2004). Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun*, 313(1), 42-47.
- Nallagatla, S. R., Hwang, J., Toroney, R., Zheng, X., Cameron, C. E., & Bevilacqua, P. C. (2007). 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science*, 318(5855), 1455-1458.
- Nanda, S., Havert, M. B., Calderon, G. M., Thomson, M., Jacobson, C., Kastner, D., et al. (2008). Hepatic transcriptome analysis of hepatitis C virus infection in chimpanzees defines unique gene expression patterns associated with viral clearance. *PLoS One*, 3(10), e3442.
- Nelson, D. R. (2001). The immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis*, 5(4), 931-953.
- Neumann-Haefelin, C., Blum, H. E., Chisari, F. V., & Thimme, R. (2005). T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol*, 32(2), 75-85.
- Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J., et al. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*, 282(5386), 103-107.
- O'Neill, L. A., & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 7(5), 353-364.
- Oganesyan, G., Saha, S. K., Guo, B., He, J. Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., et al. (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*, 439(7073), 208-211.
- Ogata, N., Alter, H. J., Miller, R. H., & Purcell, R. H. (1991). Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(8), 3392-3396.
- Okuda, M., Li, K., Beard, M. R., Showalter, L. A., Scholle, F., Lemon, S. M., et al. (2002). Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*, 122(2), 366-375.
- Olofsson, S. O., Bostrom, P., Andersson, L., Rutberg, M., Levin, M., Perman, J., et al. (2008). Triglyceride containing lipid droplets and lipid droplet-associated proteins. *Curr Opin Lipidol*, 19(5), 441-447.
- Osborn, B. L., Olsen, H. S., Nardelli, B., Murray, J. H., Zhou, J. X., Garcia, A., et al. (2002). Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 303(2), 540-548.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., & Seya, T. (2003). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol*, 4(2), 161-167.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Hatakeyama, S., & Seya, T. (2009). Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J Biol Chem*, 284(2), 807-817.
- Otsuka, M., Kato, N., Moriyama, M., Taniguchi, H., Wang, Y., Dharel, N., et al. (2005). Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology*, 41(5), 1004-1012.
- Owsianka, A. M., & Patel, A. H. (1999). Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3. *Virology*, 257(2), 330-340.
- Paik, Y. H., Schwabe, R. F., Bataller, R., Russo, M. P., Jobin, C., & Brenner, D. A. (2003). Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 37(5), 1043-1055.
- Panne, D., Maniatis, T., & Harrison, S. C. (2007). An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. *Cell*, 129(6), 1111-1123.

- Patel, K., Zekry, A., & McHutchison, J. G. (2005). Steatosis and chronic hepatitis C virus infection: mechanisms and significance. *Clin Liver Dis*, 9(3), 399-410, vi.
- Pause, A., & Sonenberg, N. (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J*, 11(7), 2643-2654.
- Pavio, N., Battaglia, S., Boucreux, D., Arnulf, B., Sobesky, R., Hermine, O., et al. (2005). Hepatitis C virus core variants isolated from liver tumor but not from adjacent non-tumor tissue interact with Smad3 and inhibit the TGF-beta pathway. *Oncogene*, 24(40), 6119-6132.
- Pavlovic, D., Neville, D. C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R. A., Fischer, W. B., et al. (2003). The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10), 6104-6108.
- Pawlotsky, J. M. (2006a). Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 299, 261-284.
- Pawlotsky, J. M. (2006b). Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets. *J Hepatol*, 44(1 Suppl), S10-13.
- Pawlotsky, J. M. (2007). Treatment of hepatitis C: don't put all your eggs in one basket! *Gastroenterology*, 132(4), 1611-1615.
- Pawlotsky, J. M., Chevaliez, S., & McHutchison, J. G. (2007). The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology*, 132(5), 1979-1998.
- Pembrey, L., Newell, M. L., & Tovo, P. A. (2005). The management of HCV infected pregnant women and their children European paediatric HCV network. *J Hepatol*, 43(3), 515-525.
- Peppel, K., Vinci, J. M., & Baglioni, C. (1991). The AU-rich sequences in the 3' untranslated region mediate the increased turnover of interferon mRNA induced by glucocorticoids. *J Exp Med*, 173(2), 349-355.
- Pereira, A. A., & Jacobson, I. M. (2009). New and experimental therapies for HCV. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 6(7), 403-411.
- Perry, A. K., Chow, E. K., Goodnough, J. B., Yeh, W. C., & Cheng, G. (2004). Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J Exp Med*, 199(12), 1651-1658.
- Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, 202, 8-32.
- Peters, R. T., & Maniatis, T. (2001). A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1471(2), M57-62.
- Petit, J. M., Benichou, M., Duvillard, L., Jooste, V., Bour, J. B., Minello, A., et al. (2003). Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *Am J Gastroenterol*, 98(5), 1150-1154.
- Pflugheber, J., Fredericksen, B., Sumpter, R., Jr., Wang, C., Ware, F., Sodora, D. L., et al. (2002). Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(7), 4650-4655.
- Pianko, S., Patella, S., Ostapowicz, G., Desmond, P., & Sievert, W. (2001). Fas-mediated hepatocyte apoptosis is increased by hepatitis C virus infection and alcohol consumption, and may be associated with hepatic fibrosis: mechanisms of liver cell injury in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*, 8(6), 406-413.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F., et al. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*, 314(5801), 997-1001.
- Pierra, C., Amador, A., Benzaria, S., Cretton-Scott, E., D'Amours, M., Mao, J., et al. (2006). Synthesis and pharmacokinetics of valopicitabine (NM283), an efficient prodrug of the potent anti-HCV agent 2'-C-methylcytidine. *J Med Chem*, 49(22), 6614-6620.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., et al. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(19), 7408-7413.

- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., et al. (2002). Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol*, *76*(8), 4008-4021.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K., & Bartenschlager, R. (2001). Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol*, *75*(3), 1252-1264.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, *282*(5390), 938-941.
- Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P., et al. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, *457*(7231), 882-886.
- Ploss, A., Khetani, S. R., Jones, C. T., Syder, A. J., Trehan, K., Gaysinskaya, V. A., et al. (2010). Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(7), 3141-3145.
- Ploss, A., & Rice, C. M. (2009). Towards a small animal model for hepatitis C. *EMBO Rep*, *10*(11), 1220-1227.
- Plumet, S., Herschke, F., Bourhis, J. M., Valentin, H., Longhi, S., & Gerlier, D. (2007). Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PLoS One*, *2*(3), e279.
- Pockros, P. J., Guyader, D., Patton, H., Tong, M. J., Wright, T., McHutchison, J. G., et al. (2007). Oral resiquimod in chronic HCV infection: safety and efficacy in 2 placebo-controlled, double-blind phase IIa studies. *J Hepatol*, *47*(2), 174-182.
- Pockros, P. J., Nelson, D., Godofsky, E., Rodriguez-Torres, M., Everson, G. T., Fried, M. W., et al. (2008). R1626 plus peginterferon Alfa-2a provides potent suppression of hepatitis C virus RNA and significant antiviral synergy in combination with ribavirin. *Hepatology*, *48*(2), 385-397.
- Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G. J., Lin, G., et al. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol*, *77*(7), 4070-4080.
- Precious, B., Childs, K., Fitzpatrick-Swallow, V., Goodbourn, S., & Randall, R. E. (2005). Simian virus 5 V protein acts as an adaptor, linking DDB1 to STAT2, to facilitate the ubiquitination of STAT1. *J Virol*, *79*(21), 13434-13441.
- Preiss, S., Thompson, A., Chen, X., Rodgers, S., Markovska, V., Desmond, P., et al. (2008). Characterization of the innate immune signalling pathways in hepatocyte cell lines. *J Viral Hepat*, *15*(12), 888-900.
- Ramratnam, B., Bonhoeffer, S., Binley, J., Hurley, A., Zhang, L., Mittler, J. E., et al. (1999). Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. *Lancet*, *354*(9192), 1782-1785.
- Randall, G., Chen, L., Panis, M., Fischer, A. K., Lindenbach, B. D., Sun, J., et al. (2006). Silencing of USP18 potentiates the antiviral activity of interferon against hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, *131*(5), 1584-1591.
- Randall, R. E., & Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*, *89*(Pt 1), 1-47.
- Ranjan, P., Bowzard, J. B., Schwerzmann, J. W., Jeisy-Scott, V., Fujita, T., & Sambhara, S. (2009). Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity. *Trends Mol Med*, *15*(8), 359-368.
- Reesink, H. W., Fanning, G. C., Farha, K. A., Weegink, C., Van Vliet, A., Van 't Klooster, G., et al. (2010). Rapid HCV-RNA decline with once daily TMC435: a phase I study in healthy volunteers and hepatitis C patients. *Gastroenterology*, *138*(3), 913-921.
- Reesink, H. W., Zeuzem, S., Weegink, C. J., Forestier, N., van Vliet, A., van de Wetering de Rooij, J., et al. (2006). Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950: a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. *Gastroenterology*, *131*(4), 997-1002.

- Rehermann, B. (2007). Chronic infections with hepatotropic viruses: mechanisms of impairment of cellular immune responses. *Semin Liver Dis*, 27(2), 152-160.
- Rehermann, B. (2009). Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest*, 119(7), 1745-1754.
- Rehermann, B., & Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 5(3), 215-229.
- Reich, N. C. (2007). STAT dynamics. *Cytokine Growth Factor Rev*, 18(5-6), 511-518.
- Riordan, S. M., Skinner, N. A., Kurtovic, J., Locarnini, S., McIver, C. J., Williams, R., et al. (2006). Toll-like receptor expression in chronic hepatitis C: correlation with pro-inflammatory cytokine levels and liver injury. *Inflamm Res*, 55(7), 279-285.
- Ritchie, K. J., Hahn, C. S., Kim, K. I., Yan, M., Rosario, D., Li, L., et al. (2004). Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. *Nat Med*, 10(12), 1374-1378.
- Roberts, E. A., & Yeung, L. (2002). Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 36(5 Suppl 1), S106-113.
- Roberts, S. K., Cooksley, G., Dore, G. J., Robson, R., Shaw, D., Berns, H., et al. (2008). Robust antiviral activity of R1626, a novel nucleoside analog: a randomized, placebo-controlled study in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 48(2), 398-406.
- Rodrigue-Gervais, I. G., Jouan, L., Beaulieu, G., Sauve, D., Bruneau, J., Willems, B., et al. (2007). Poly(I:C) and lipopolysaccharide innate sensing functions of circulating human myeloid dendritic cells are affected in vivo in hepatitis C virus-infected patients. *J Virol*, 81(11), 5537-5546.
- Rodriguez, C. I., Nogal, M. L., Carrascosa, A. L., Salas, M. L., Fresno, M., & Revilla, Y. (2002). African swine fever virus IAP-like protein induces the activation of nuclear factor kappa B. *J Virol*, 76(8), 3936-3942.
- Ronco, L. V., Karpova, A. Y., Vidal, M., & Howley, P. M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*, 12(13), 2061-2072.
- Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B. G., Schoenemeyer, A., et al. (2005). The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol*, 175(8), 5260-5268.
- Ruckdeschel, K., Pfaffinger, G., Haase, R., Sing, A., Weighardt, H., Hacker, G., et al. (2004). Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. *J Immunol*, 173(5), 3320-3328.
- Ruiter, D. J., van der Meulen, J., Brouwer, A., Hummel, M. J., Mauw, B. J., van der Ploeg, J. C., et al. (1981). Uptake by liver cells of endotoxin following its intravenous injection. *Lab Invest*, 45(1), 38-45.
- Ryals, J., Dierks, P., Ragg, H., & Weissmann, C. (1985). A 46-nucleotide promoter segment from an IFN-alpha gene renders an unrelated promoter inducible by virus. *Cell*, 41(2), 497-507.
- Ryo, A., Suizu, F., Yoshida, Y., Perrem, K., Liou, Y. C., Wulf, G., et al. (2003). Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell*, 12(6), 1413-1426.
- Sadler, A. J., Latchoumanin, O., Hawkes, D., Mak, J., & Williams, B. R. (2009). An antiviral response directed by PKR phosphorylation of the RNA helicase A. *PLoS Pathog*, 5(2), e1000311.
- Saha, S. K., Pietras, E. M., He, J. Q., Kang, J. R., Liu, S. Y., Oganessian, G., et al. (2006). Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J*, 25(14), 3257-3263.



- Saira, K., Zhou, Y., & Jones, C. (2007). The infected cell protein 0 encoded by bovine herpesvirus 1 (bICP0) induces degradation of interferon response factor 3 and, consequently, inhibits beta interferon promoter activity. *J Virol*, *81*(7), 3077-3086.
- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y. M., Owen, D., Johnson, C. L., Sinha, S. C., et al. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(2), 582-587.
- Saito, T., Owen, D. M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., & Gale, M., Jr. (2008). Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature*, *454*(7203), 523-527.
- Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H., et al. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(20), 11646-11651.
- Sakamoto, N., Wu, C. H., & Wu, G. Y. (1996). Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes. *J Clin Invest*, *98*(12), 2720-2728.
- Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G., & Monica, N. (1995). The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol*, *69*(12), 7461-7471.
- Sarasin-Filipowicz, M., Krol, J., Markiewicz, I., Heim, M. H., & Filipowicz, W. (2009). Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat Med*, *15*(1), 31-33.
- Sarasin-Filipowicz, M., Oakeley, E. J., Duong, F. H., Christen, V., Terracciano, L., Filipowicz, W., et al. (2008). Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(19), 7034-7039.
- Sarkar, S. N., Elco, C. P., Peters, K. L., Chattopadhyay, S., & Sen, G. C. (2007). Two tyrosine residues of Toll-like receptor 3 trigger different steps of NF-kappa B activation. *J Biol Chem*, *282*(6), 3423-3427.
- Sarkar, S. N., Peters, K. L., Elco, C. P., Sakamoto, S., Pal, S., & Sen, G. C. (2004). Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol*, *11*(11), 1060-1067.
- Sarkar, S. N., Smith, H. L., Rowe, T. M., & Sen, G. C. (2003). Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, *278*(7), 4393-4396.
- Sasai, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Inoue, N., Fujita, F., Nakanishi, M., et al. (2005). Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol*, *174*(1), 27-30.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., et al. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*, *13*(4), 539-548.
- Sato, M., Tanaka, N., Hata, N., Oda, E., & Taniguchi, T. (1998). Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett*, *425*(1), 112-116.
- Saunier, B., Triyatni, M., Ulianich, L., Maruvada, P., Yen, P., & Kohn, L. D. (2003). Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol*, *77*(1), 546-559.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., et al. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*, *21*(19), 5017-5025.
- Schlee, M., Hartmann, E., Coch, C., Wimmenauer, V., Janke, M., Barchet, W., et al. (2009). Approaching the RNA ligand for RIG-I? *Immunol Rev*, *227*(1), 66-74.

- Schmidt, A., Schwerd, T., Hamm, W., Hellmuth, J. C., Cui, S., Wenzel, M., et al. (2009). 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(29), 12067-12072.
- Schott, E., Witt, H., Neumann, K., Taube, S., Oh, D. Y., Schreier, E., et al. (2007). A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. *J Hepatol*, *47*(2), 203-211.
- Schroder, M., Baran, M., & Bowie, A. G. (2008). Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *EMBO J*, *27*(15), 2147-2157.
- Schuchmann, M., Hermann, F., Herkel, J., van der Zee, R., Galle, P. R., & Lohse, A. W. (2004). HSP60 and CpG-DNA-oligonucleotides differentially regulate LPS-tolerance of hepatic Kupffer cells. *Immunol Lett*, *93*(2-3), 199-204.
- Schulz, O., Diebold, S. S., Chen, M., Naslund, T. I., Nolte, M. A., Alexopoulou, L., et al. (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*, *433*(7028), 887-892.
- Schwabe, R. F., Seki, E., & Brenner, D. A. (2006). Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology*, *130*(6), 1886-1900.
- Sebban-Benin, H., Pescatore, A., Fusco, F., Pascuale, V., Gautheron, J., Yamaoka, S., et al. (2007). Identification of TRAF6-dependent NEMO polyubiquitination sites through analysis of a new NEMO mutation causing incontinentia pigmenti. *Hum Mol Genet*, *16*(23), 2805-2815.
- Seiwert, S. D., Andrews, S. W., Jiang, Y., Serebryany, V., Tan, H., Kossen, K., et al. (2008). Preclinical characteristics of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor ITMN-191 (R7227). *Antimicrob Agents Chemother*, *52*(12), 4432-4441.
- Seki, E., & Brenner, D. A. (2008). Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology*, *48*(1), 322-335.
- Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C. H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D. A., et al. (2007). TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*, *13*(11), 1324-1332.
- Seth, R. B., Sun, L., & Chen, Z. J. (2006). Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res*, *16*(2), 141-147.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., & Chen, Z. J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*, *122*(5), 669-682.
- Sharma, P., & Lok, A. (2006). Viral hepatitis and liver transplantation. *Semin Liver Dis*, *26*(3), 285-297.
- Sharma, S., Tenover, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R., & Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*, *300*(5622), 1148-1151.
- Shepard, C. W., Finelli, L., & Alter, M. J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*, *5*(9), 558-567.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., et al. (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, *4*(1), 63-68.
- Shiina, M., & Rehmann, B. (2008). Cell culture-produced hepatitis C virus impairs plasmacytoid dendritic cell function. *Hepatology*, *47*(2), 385-395.
- Shimada, T., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Inoue, J., Tatsumi, Y., et al. (1999). IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol*, *11*(8), 1357-1362.
- Siagris, D., Christofidou, M., Theocharis, G. J., Pagoni, N., Papadimitriou, C., Lekkou, A., et al. (2006). Serum lipid pattern in chronic hepatitis C: histological and virological correlations. *J Viral Hepat*, *13*(1), 56-61.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., et al. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, *284*(5421), 1835-1837.

- Simmonds, P. (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol*, 85(Pt 11), 3173-3188.
- Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T. A., Chan, S. W., McOmish, F., Irvine, B., et al. (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*, 74 (Pt 11), 2391-2399.
- Smith, M. W., Walters, K. A., Korth, M. J., Fitzgibbon, M., Proll, S., Thompson, J. C., et al. (2006). Gene expression patterns that correlate with hepatitis C and early progression to fibrosis in liver transplant recipients. *Gastroenterology*, 130(1), 179-187.
- Smith, M. W., Yue, Z. N., Korth, M. J., Do, H. A., Boix, L., Fausto, N., et al. (2003). Hepatitis C virus and liver disease: global transcriptional profiling and identification of potential markers. *Hepatology*, 38(6), 1458-1467.
- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Junemann, C., Bartenschlager, R., & Niepmann, M. (2006). The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol*, 80(23), 11579-11588.
- Soulat, D., Burckstummer, T., Westermayer, S., Goncalves, A., Bauch, A., Stefanovic, A., et al. (2008). The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response. *EMBO J*, 27(15), 2135-2146.
- Stack, J., Haga, I. R., Schroder, M., Bartlett, N. W., Maloney, G., Reading, P. C., et al. (2005). Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med*, 201(6), 1007-1018.
- Stancato, L. F., David, M., Carter-Su, C., Lerner, A. C., & Pratt, W. B. (1996). Preassociation of STAT1 with STAT2 and STAT3 in separate signalling complexes prior to cytokine stimulation. *J Biol Chem*, 271(8), 4134-4137.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., & Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 67, 227-264.
- Steinkuhler, C., Biasiol, G., Brunetti, M., Urbani, A., Koch, U., Cortese, R., et al. (1998). Product inhibition of the hepatitis C virus NS3 protease. *Biochemistry*, 37(25), 8899-8905.
- Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A. H., Bartenschlager, R., & Pietschmann, T. (2007). Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog*, 3(7), e103.
- Stetson, D. B., & Medzhitov, R. (2006). Antiviral defense: interferons and beyond. *J Exp Med*, 203(8), 1837-1841.
- Stiffler, J. D., Nguyen, M., Sohn, J. A., Liu, C., Kaplan, D., & Seeger, C. (2009). Focal distribution of hepatitis C virus RNA in infected livers. *PLoS One*, 4(8), e6661.
- Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Supekova, L., Thimme, R., et al. (2002). Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24), 15669-15674.
- Su, G. L., Klein, R. D., Aminlari, A., Zhang, H. Y., Steinstraesser, L., Alarcon, W. H., et al. (2000). Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology*, 31(4), 932-936.
- Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., et al. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol*, 79(5), 2689-2699.
- Sun, Q., Sun, L., Liu, H. H., Chen, X., Seth, R. B., Forman, J., et al. (2006). The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity*, 24(5), 633-642.
- Sun, R., & Gao, B. (2004). Negative regulation of liver regeneration by innate immunity (natural killer cells/interferon-gamma). *Gastroenterology*, 127(5), 1525-1539.
- Sun, S. C. (2008). Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol*, 8(7), 501-511.

- Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M. L., et al. (2009). IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*, *41*(10), 1100-1104.
- Suzuki, T., Ishii, K., Aizaki, H., & Wakita, T. (2007). Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev*, *59*(12), 1200-1212.
- Sweeting, M. J., De Angelis, D., Brant, L. J., Harris, H. E., Mann, A. G., & Ramsay, M. E. (2007). The burden of hepatitis C in England. *J Viral Hepat*, *14*(8), 570-576.
- Taguchi, T., Nagano-Fujii, M., Akutsu, M., Kadoya, H., Ohgimoto, S., Ishido, S., et al. (2004). Hepatitis C virus NS5A 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), 959-969.
- Tait, S. W., Reid, E. B., Greaves, D. R., Wileman, T. E., & Powell, P. P. (2000). Mechanism of inactivation of NF-kappa B by a viral homologue of I kappa b alpha. Signal-induced release of i kappa b alpha results in binding of the viral homologue to NF-kappa B. *J Biol Chem*, *275*(44), 34656-34664.
- Takahashi, K., Kumeta, H., Tsuduki, N., Narita, R., Shigemoto, T., Hirai, R., et al. (2009). Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. *J Biol Chem*, *284*(26), 17465-17474.
- Takahashi, K., Yoneyama, M., Nishihori, T., Hirai, R., Kumeta, H., Narita, R., et al. (2008). Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell*, *29*(4), 428-440.
- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., et al. (2000). Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med*, *6*(5), 578-582.
- Takaoka, A., & Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol*, *8*(6), 907-922.
- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., et al. (2005). Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, *434*(7030), 243-249.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev*, *227*(1), 75-86.
- Taloczy, Z., Jiang, W., Virgin, H. W. t., Leib, D. A., Scheuner, D., Kaufman, R. J., et al. (2002). Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(1), 190-195.
- Taloczy, Z., Virgin, H. W. t., & Levine, B. (2006). PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy*, *2*(1), 24-29.
- Tan, S. L., He, Y., Huang, Y., & Gale, M., Jr. (2004). Strategies for hepatitis C therapeutic intervention: now and next. *Curr Opin Pharmacol*, *4*(5), 465-470.
- Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., Kurosaki, M., Matsuura, K., Sakamoto, N., et al. (2009). Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*, *41*(10), 1105-1109.
- Tang, E. D., & Wang, C. Y. (2009). MAVS self-association mediates antiviral innate immune signaling. *J Virol*, *83*(8), 3420-3428.
- Tang, H., & Grise, H. (2009). Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond)*, *117*(2), 49-65.
- Tang, X., Gao, J. S., Guan, Y. J., McLane, K. E., Yuan, Z. L., Ramratnam, B., et al. (2007). Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor. *Cell*, *131*(1), 93-105.
- Taniguchi, T., Fujii-Kuriyama, Y., & Muramatsu, M. (1980). Molecular cloning of human interferon cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *77*(7), 4003-4006.
- Targett-Adams, P., Boulant, S., & McLauchlan, J. (2008). Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, *82*(5), 2182-2195.

- Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N., & Lai, M. M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*, *285*(5424), 107-110.
- Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., & Treadaway, J. (2008). Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog*, *4*(3), e1000032.
- Tenoever, B. R., Ng, S. L., Chua, M. A., McWhirter, S. M., Garcia-Sastre, A., & Maniatis, T. (2007). Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity. *Science*, *315*(5816), 1274-1278.
- Tenoever, B. R., Sharma, S., Zou, W., Sun, Q., Grandvaux, N., Julkunen, I., et al. (2004). Activation of TBK1 and IKKvarepsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *J Virol*, *78*(19), 10636-10649.
- Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B., & Kono, D. H. (2005). Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*, *23*, 307-336.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K. M., Steiger, C., Ray, S. C., & Chisari, F. V. (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med*, *194*(10), 1395-1406.
- Thomson, B. J. (2009). Hepatitis C virus: the growing challenge. *Br Med Bull*, *89*, 153-167.
- Tian, B., Bevilacqua, P. C., Diegelman-Parente, A., & Mathews, M. B. (2004). The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *5*(12), 1013-1023.
- Toniutto, P., Fabris, C., Bitetto, D., Fumolo, E., Fornasiere, E., & Pirisi, M. (2008). R-1626, a specific oral NS5B polymerase inhibitor of hepatitis C virus. *IDrugs*, *11*(10), 738-749.
- Tsubouchi, E., Akbar, S. M., Horiike, N., & Onji, M. (2004). Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol*, *39*(8), 754-762.
- Tuplin, A., Evans, D. J., & Simmonds, P. (2004). Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods. *J Gen Virol*, *85*(Pt 10), 3037-3047.
- Uematsu, S., Sato, S., Yamamoto, M., Hirotani, T., Kato, H., Takeshita, F., et al. (2005). Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction. *J Exp Med*, *201*(6), 915-923.
- Uhrig, A., Banafsche, R., Kremer, M., Hegenbarth, S., Hamann, A., Neurath, M., et al. (2005). Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol*, *77*(5), 626-633.
- Unterstab, G., Ludwig, S., Anton, A., Planz, O., Dauber, B., Krappmann, D., et al. (2005). Viral targeting of the interferon- $\beta$ -inducing Traf family member-associated NF- $\kappa$ B activator (TANK)-binding kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(38), 13640-13645.
- Uze, G., & Monneron, D. (2007). IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie*, *89*(6-7), 729-734.
- Uzri, D., & Gehrke, L. (2009). Nucleotide sequences and modifications that determine RIG-I/RNA binding and signaling activities. *J Virol*, *83*(9), 4174-4184.
- van Boxel-Dezaire, A. H., Rani, M. R., & Stark, G. R. (2006). Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity*, *25*(3), 361-372.
- van Egmond, M., van Garderen, E., van Spriel, A. B., Damen, C. A., van Amersfoort, E. S., van Zandbergen, G., et al. (2000). Fc $\alpha$ RI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med*, *6*(6), 680-685.
- Vandelli, C., Renzo, F., Romano, L., Tisminetzky, S., De Palma, M., Stroffolini, T., et al. (2004). Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. *Am J Gastroenterol*, *99*(5), 855-859.
- Vercammen, E., Staal, J., & Beyaert, R. (2008). Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev*, *21*(1), 13-25.

- Vilcek, J. (2006). Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. *Immunity*, 25(3), 343-348.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., et al. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, 11(7), 791-796.
- Walker, C. M. (1997). Comparative features of hepatitis C virus infection in humans and chimpanzees. *Springer Semin Immunopathol*, 19(1), 85-98.
- Walsh, M. J., Jonsson, J. R., Richardson, M. M., Lipka, G. M., Purdie, D. M., Clouston, A. D., et al. (2006). Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1. *Gut*, 55(4), 529-535.
- Walters, K. A., Joyce, M. A., Thompson, J. C., Smith, M. W., Yeh, M. M., Proll, S., et al. (2006a). 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.
- Walters, K. A., & Katze, M. G. (2009). Using high-throughput genomics to study hepatitis C: what determines the outcome of infection? *Antiviral Res*, 81(3), 198-208.
- Walters, K. A., Smith, M. W., Pal, S., Thompson, J. C., Thomas, M. J., Yeh, M. M., et al. (2006b). Identification of a specific gene expression pattern associated with HCV-induced pathogenesis in HCV- and HCV/HIV-infected individuals. *Virology*, 350(2), 453-464.
- Walters, K. A., Syder, A. J., Lederer, S. L., Diamond, D. L., Paeper, B., Rice, C. M., et al. (2009). Genomic analysis reveals a potential role for cell cycle perturbation in HCV-mediated apoptosis of cultured hepatocytes. *PLoS Pathog*, 5(1), e1000269.
- Wang, C., Sarnow, P., & Siddiqui, A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol*, 67(6), 3338-3344.
- Wang, N., Liang, Y., Devaraj, S., Wang, J., Lemon, S. M., & Li, K. (2009). Toll-like receptor 3 mediates establishment of an antiviral state against hepatitis C virus in hepatoma cells. *J Virol*, 83(19), 9824-9834.
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E., & Flavell, R. A. (2004a). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med*, 10(12), 1366-1373.
- Wang, T. C., & Chao, M. (2005). RNA recombination of hepatitis delta virus in natural mixed-genotype infection and transfected cultured cells. *J Virol*, 79(4), 2221-2229.
- Wang, W., Lahser, F. C., Yi, M., Wright-Minogue, J., Xia, E., Weber, P. C., et al. (2004b). Conserved C-terminal threonine of hepatitis C virus NS3 regulates autoproteolysis and prevents product inhibition. *J Virol*, 78(2), 700-709.
- Wang, X., Hinson, E. R., & Cresswell, P. (2007). The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host Microbe*, 2(2), 96-105.
- Wasley, A., & Alter, M. J. (2000). Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis*, 20(1), 1-16.
- Watanabe, A., Hashmi, A., Gomes, D. A., Town, T., Badou, A., Flavell, R. A., et al. (2007). Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9. *Hepatology*, 46(5), 1509-1518.
- Waters, L., & Nelson, M. (2006). New therapeutic options for hepatitis C. *Curr Opin Infect Dis*, 19(6), 615-622.
- Wathelet, M. G., Lin, C. H., Parekh, B. S., Ronco, L. V., Howley, P. M., & Maniatis, T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell*, 1(4), 507-518.
- Watson, J. (2002). Prospects for hepatitis C virus therapeutics: levovirin and viremide as improved derivatives of ribavirin. *Curr Opin Investig Drugs*, 3(5), 680-683.

- Wawrzynowicz-Syczewska, M., Kubicka, J., Lewandowski, Z., Boron-Kaczmarek, A., & Radkowski, M. (2004). Natural history of acute symptomatic hepatitis type C. *Infection*, 32(3), 138-143.
- Weber, F., Haller, O., & Kochs, G. (2000). MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. *J Virol*, 74(1), 560-563.
- Webster, D. P., Klenerman, P., Collier, J., & Jeffery, K. J. (2009). Development of novel treatments for hepatitis C. *Lancet Infect Dis*, 9(2), 108-117.
- Weeks, K. M., Ampe, C., Schultz, S. C., Steitz, T. A., & Crothers, D. M. (1990). Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science*, 249(4974), 1281-1285.
- Weiner, A., Erickson, A. L., Kansopon, J., Crawford, K., Muchmore, E., Hughes, A. L., et al. (1995). Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(7), 2755-2759.
- Weissmann, C., & Weber, H. (1986). The interferon genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 33, 251-300.
- Wiest, R., & Garcia-Tsao, G. (2005). Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology*, 41(3), 422-433.
- Williams, B. R. (2001). Signal integration via PKR. *Sci STKE*, 2001(89), RE2.
- Wolk, B., Buchele, B., Moradpour, D., & Rice, C. M. (2008). A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes. *J Virol*, 82(21), 10519-10531.
- Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H. G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E., et al. (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol*, 74(5), 2293-2304.
- Wu, J., Lu, M., Meng, Z., Trippler, M., Broering, R., Szczeponek, A., et al. (2007). Toll-like receptor-mediated control of HBV replication by nonparenchymal liver cells in mice. *Hepatology*, 46(6), 1769-1778.
- Xu, L. G., Wang, Y. Y., Han, K. J., Li, L. Y., Zhai, Z., & Shu, H. B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*, 19(6), 727-740.
- Yagi, S., Mori, K., Tanaka, E., Matsumoto, A., Sunaga, F., Kiyosawa, K., et al. (2005). Identification of novel HCV subgenome replicating persistently in chronic active hepatitis C patients. *J Med Virol*, 77(3), 399-413.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., et al. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301(5633), 640-643.
- Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U., & Bukh, J. (1997). Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(16), 8738-8743.
- Yanagi, M., St Claire, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H., & 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), 2291-2295.
- Yang, K., Puel, A., Zhang, S., Eidenschenk, C., Ku, C. L., Casrouge, A., et al. (2005). Human TLR-7-, -8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity*, 23(5), 465-478.
- Yang, Y., Liang, Y., Qu, L., Chen, Z., Yi, M., Li, K., et al. (2007). Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(17), 7253-7258.
- Yang, Y. L., Reis, L. F., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Schafer, R., Kumar, A., et al. (1995). Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *EMBO J*, 14(24), 6095-6106.
- Yao, N., Hesson, T., Cable, M., Hong, Z., Kwong, A. D., Le, H. V., et al. (1997). Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat Struct Biol*, 4(6), 463-467.

- Yao, N., Reichert, P., Taremi, S. S., Prosise, W. W., & Weber, P. C. (1999). Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure*, *7*(11), 1353-1363.
- Ye, J., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Brown, M. S., Goldstein, J. L., & Gale, M., Jr. (2003). Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(26), 15865-15870.
- Yedavalli, V. S., Neuveut, C., Chi, Y. H., Kleiman, L., & Jeang, K. T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell*, *119*(3), 381-392.
- Yi, M., & Lemon, S. M. (2003). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol*, *77*(6), 3557-3568.
- 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*(7), 2310-2315.
- Yokoo, H., Kondo, T., Fujii, K., Yamada, T., Todo, S., & Hirohashi, S. (2004). Proteomic signature corresponding to alpha fetoprotein expression in liver cancer cells. *Hepatology*, *40*(3), 609-617.
- Yoneyama, M., & Fujita, T. (2007). Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem*, *282*(21), 15315-15318.
- Yoneyama, M., & Fujita, T. (2008). Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors. *Immunity*, *29*(2), 178-181.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., et al. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, *175*(5), 2851-2858.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., et al. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, *5*(7), 730-737.
- Yoneyama, M., Onomoto, K., & Fujita, T. (2008). Cytoplasmic recognition of RNA. *Adv Drug Deliv Rev*, *60*(7), 841-846.
- Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E., & Fujita, T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J*, *17*(4), 1087-1095.
- Yoshida, R., Takaesu, G., Yoshida, H., Okamoto, F., Yoshioka, T., Choi, Y., et al. (2008). TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway. *J Biol Chem*, *283*(52), 36211-36220.
- You, L. R., Chen, C. M., Yeh, T. S., Tsai, T. Y., Mai, R. T., Lin, C. H., et al. (1999). Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol*, *73*(4), 2841-2853.
- You, S., Stump, D. D., Branch, A. D., & 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), 1352-1366.
- Yu, C. Y., Chiang, R. L., Chang, T. H., Liao, C. L., & Lin, Y. L. (2010). The interferon stimulator mitochondrial antiviral signaling protein facilitates cell death by disrupting the mitochondrial membrane potential and by activating caspases. *J Virol*, *84*(5), 2421-2431.
- Yu, Y., Wang, S. E., & Hayward, G. S. (2005). The KSHV immediate-early transcription factor RTA encodes ubiquitin E3 ligase activity that targets IRF7 for proteasome-mediated degradation. *Immunity*, *22*(1), 59-70.
- Zahn, R. C., Schelp, I., Utermohlen, O., & von Laer, D. (2007). A-to-G hypermutation in the genome of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol*, *81*(2), 457-464.
- Zeuzem, S. (2008). Telaprevir, peginterferon alfa-2a, and ribavirin for 28 days in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*, *49*(2), 157-159.



- Zeuzem, S., Schmidt, J. M., Lee, J. H., von Wagner, M., Teuber, G., & Roth, W. K. (1998). Hepatitis C virus dynamics in vivo: effect of ribavirin and interferon alfa on viral turnover. *Hepatology*, 28(1), 245-252.
- Zhang, H., Hanecak, R., Brown-Driver, V., Azad, R., Conklin, B., Fox, M. C., et al. (1999). Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(2), 347-353.
- Zhang, M., Tian, Y., Wang, R. P., Gao, D., Zhang, Y., Diao, F. C., et al. (2008a). Negative feedback regulation of cellular antiviral signaling by RBCCK1-mediated degradation of IRF3. *Cell Res*, 18(11), 1096-1104.
- Zhang, M., Wu, X., Lee, A. J., Jin, W., Chang, M., Wright, A., et al. (2008b). Regulation of I $\kappa$ B kinase-related kinases and antiviral responses by tumor suppressor CYLD. *J Biol Chem*, 283(27), 18621-18626.
- Zhang, S. Y., Jouanguy, E., Ugolini, S., Smahi, A., Elain, G., Romero, P., et al. (2007). TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science*, 317(5844), 1522-1527.
- Zhang, Y., Guo, Y., Lv, K., Wang, K., & Sun, S. (2008c). Molecular cloning and functional characterization of porcine toll-like receptor 7 involved in recognition of single-stranded RNA virus/ssRNA. *Mol Immunol*, 45(4), 1184-1190.
- Zhang, Y. L., Guo, Y. J., Bin, L., & Sun, S. H. (2009). Hepatitis C virus single-stranded RNA induces innate immunity via Toll-like receptor 7. *J Hepatol*, 51(1), 29-38.
- Zhao, C., Denison, C., Huijbregtse, J. M., Gygi, S., & Krug, R. M. (2005). Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(29), 10200-10205.
- Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., et al. (2007). Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol*, 81(22), 12465-12471.
- Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y. Y., Li, Y., Diao, F., et al. (2008). The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity*, 29(4), 538-550.
- Zhong, B., Zhang, L., Lei, C., Li, Y., Mao, A. P., Yang, Y., et al. (2009). The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity*, 30(3), 397-407.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., et al. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(26), 9294-9299.
- Zhou, Z., Hamming, O. J., Ank, N., Paludan, S. R., Nielsen, A. L., & Hartmann, R. (2007). Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J Virol*, 81(14), 7749-7758.
- Zhu, Q., Guo, J. T., & Seeger, C. (2003). Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J Virol*, 77(17), 9204-9210.
- Zorde-Khvaleyevsky, E., Abramovitch, R., Barash, H., Spivak-Pohis, I., Rivkin, L., Rachmilewitz, J., et al. (2009). Toll-like receptor 3 signaling attenuates liver regeneration. *Hepatology*, 50(1), 198-206.

## ANNEXE 1: Résultats supplémentaires

**Étude de la fonctionnalité des voies de détection de l'ARNdb dans des préparations d'hépatocytes primaires humains chroniquement infectés avec le VHC mis en culture**

Nous avons démontré dans le Chapitre 4 qu'une réponse antivirale est en cours dans des hépatocytes humains provenant de biopsies de foies chroniquement infectés avec le VHC, et ce, en dépit de la présence d'ARN et de protéines virales. Puisque nous avons mis en évidence une diminution de la protéine CARDIF ainsi qu'une corrélation négative entre les niveaux d'ARN viraux et les niveaux d'ISGs, nous avons également conclu qu'en dépit de la stimulation des ISGs que l'on a observée, des stratégies virales de subversion sont en cours. Disposant de cultures d'hépatocytes primaires provenant de biopsies de foies chroniquement infectés avec le VHC, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalité des voies de détection de l'ARNdb intra et extracellulaire lorsque ces préparations sont mises en culture.

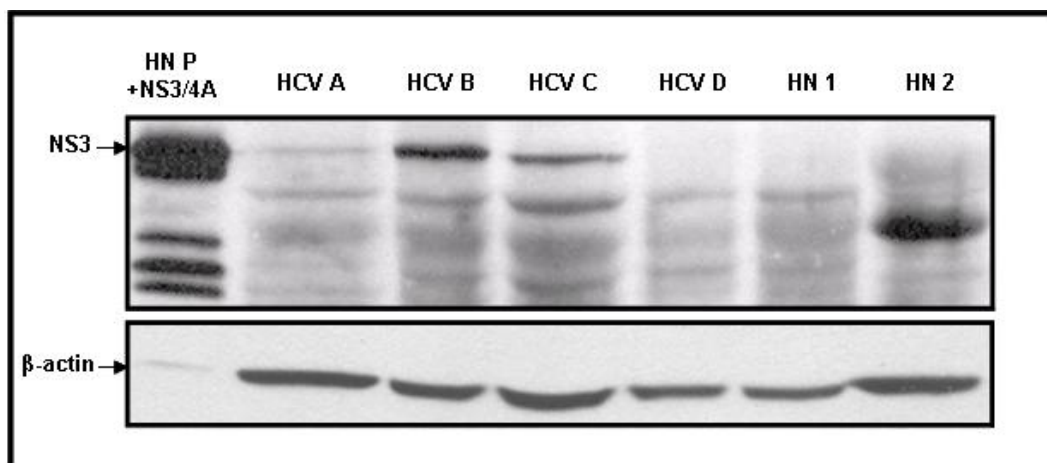
Parmi les échantillons d'hépatocytes isolés à partir des biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC et de patients non infectés constituant nos échantillons contrôles, nous avons pu mettre en culture 13 de ces préparations (**Table S1**) et (**Table S1, Chapitre 2**). En utilisant notre technique de quantification d'ARN viral par FRET que nous avons détaillée dans l'annexe 2, nous avons déterminé que les niveaux d'ARN viral de ces préparations variaient entre 5-7 log<sub>10</sub> copies/μg d'ARN total, ce qui représente, si l'on considère que 100% des cellules sont infectées, de 2 à 200 copies de génome viral par cellule. De plus, dans certaines de ces préparations, il a été possible de détecter la présence de la protéase NS3/4A par immunobuvardage, comme présenté à la **Fig. S1**. Toutefois, il apparaît clairement que les niveaux de protéase obtenus dans les échantillons provenant des cultures primaires chroniquement infectées sont beaucoup plus faibles (environ 1000 fois) que ceux obtenus suite à l'expression ectopique de NS3/4A par un vecteur lentiviral, si l'on assume que l'affinité de l'anticorps utilisé est la même dans les deux cas.

**Table S1:** Demographic characteristics of chronically HCV-infected patients

Livers ID	Age (years)	Gender <sup>a</sup>	genotype	Prior treatment	HCV RNA copies/ $\mu$ g total RNA <sup>b</sup>
HCV B	44	M	2	N	32 272 580
HCV E	51	M	1-A	N	22 217 213
HCV F	59	M	1-B	Y	2 260 387
HCV G	48	M	1-A	Y	1 023 680
HCV H	48	M	1-A	N	918 573
HCV I	61	M	4	Y	786 840
HCV K	43	M	3-A	N	48 338 496
HCV L	54	M	1-A	N	14 862 333
HCV M	55	M	3-A	Y	6 789 987
HCV Q	52	M	1-A	Y	18 694 745
HCV R	67	F	1-B	Y	18 330 480
HCV S	65	M	4-A	Y	NA
HCV T	NA	NA	NA	NA	NA

<sup>a</sup> Abbreviations: M, male; F, female

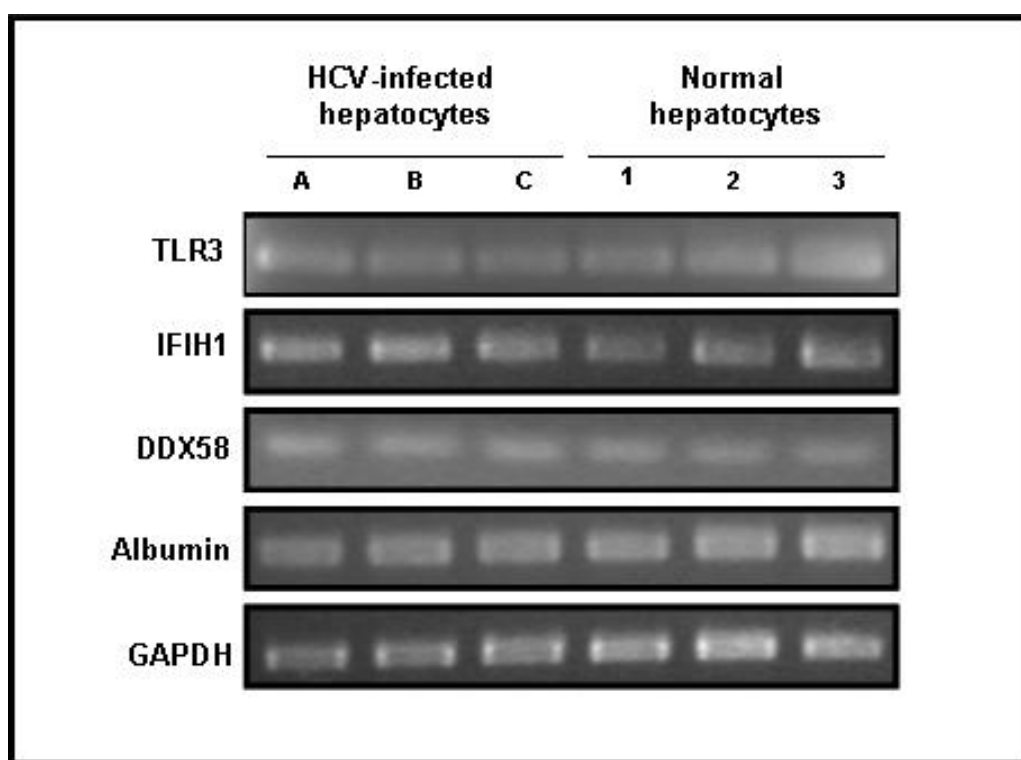
<sup>b</sup> Viral RNA is measured by a nested real time qRT-PCR assay using FRET technology on a Rotorgene 3000 instrument. The detection threshold is 400 HCV sense-strand copies per total  $\mu$ g cellular RNA.



**Figure S1 :** Expression de NS3/4A dans des préparations d'hépatocytes primaires provenant de biopsies de foies chroniquement infectés avec le VHC mises en culture

Des extraits de protéines totales (50 à 100 $\mu$ g) provenant de différentes préparations d'hépatocytes primaires chroniquement infectés avec le VHC ont été analysés par immunobuvardage en utilisant un anticorps dirigé contre NS3/4A (voir **Material and Methods, Chapitre 2**). Un extrait protéique (100ng) provenant d'une préparation d'hépatocytes primaires normaux exprimant la protéase virale ectopiquement au moyen d'un vecteur lentiviral sert de contrôle positif (ligne HN P+NS3/4A). Les extraits de protéines totales provenant de préparations d'hépatocytes normaux servent de contrôles négatifs (lignes HN 1 et HN 2). La  $\beta$ -actine permet de normaliser les quantités de protéines dans chaque puit.

Dans ces cultures d'hépatocytes humains chroniquement infectés avec le VHC de façon relativement stable pendant cinq jours de culture (voir **Annexe 3**), exprimant la protéase NS3/4A et dans lesquelles nous pouvions détecter de hauts niveaux d'ARN viral, nous avons effectué des expériences de cinétique et de dose-réponse afin de caractériser la fonctionnalité des voies de détection de l'ARNdb. Au préalable, nous avons confirmé par RT-PCR semi-quantitatif l'expression des récepteurs à ARNdb, à savoir *TLR3*, *IFIH1* (MDA5) et *DDX58* (RIG-I). Nous avons utilisé l'Albumine et la GAPDH pour normaliser nos résultats. Comme nous le voyons à la **Fig. S2**, les niveaux d'expression de ces gènes entre des préparations d'hépatocytes primaires normaux et chroniquement infectés en culture sont comparables.

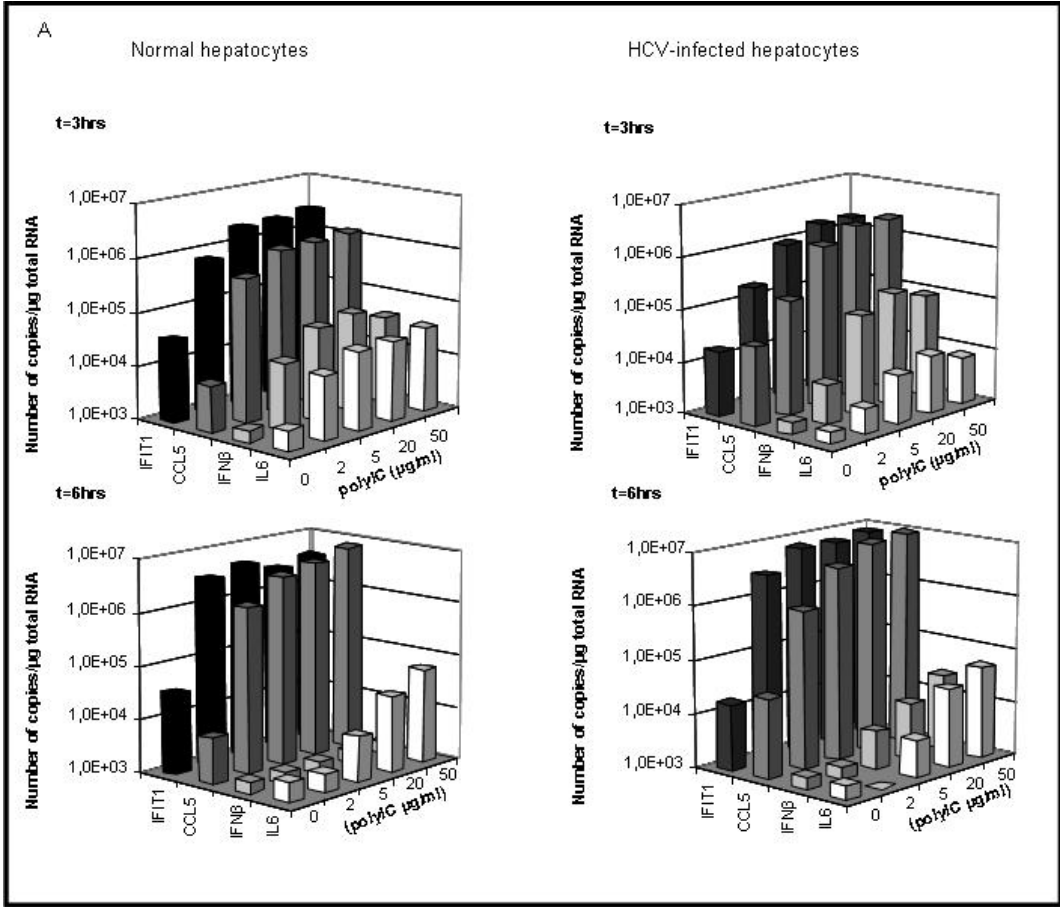


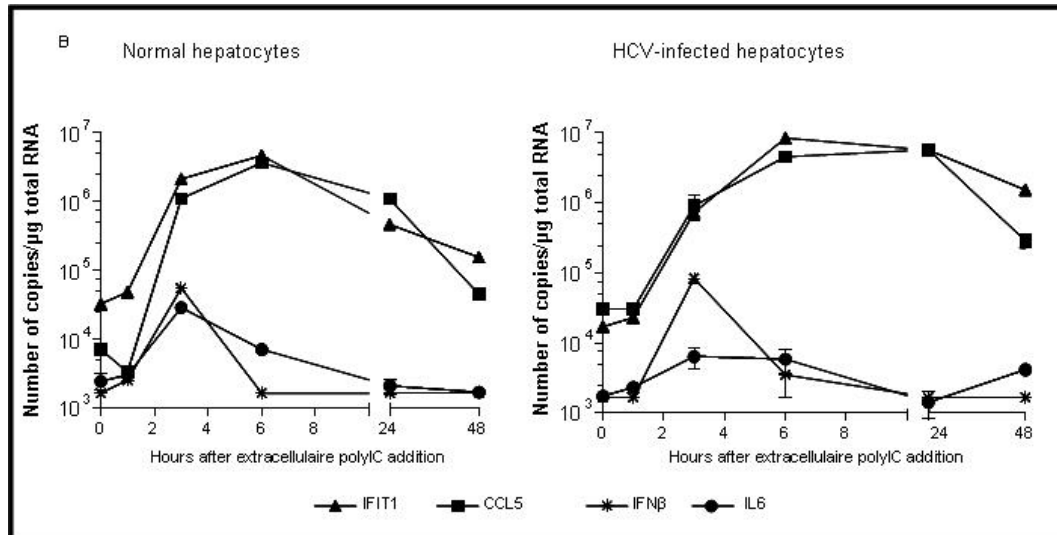
**Figure S2** : Expression des ARNm codant pour les récepteurs de l'immunité innée TLR3, MDA5 et RIG-I dans des hépatocytes primaires chroniquement infectés avec le VHC et normaux

Les hépatocytes chroniquement infectés et normaux ont été isolés à partir de biopsies de foies et mis en culture. Après extraction de l'ARN total cellulaire, reverse-transcription et PCR (voir **Supplemental Material and Methods, Chapitre 2**), les produits d'amplification ont été mis sur gel d'agarose. Les résultats des RT-PCR semi-quantitatifs ont été obtenus sur trois différentes préparations infectées (A, B et C) et normales (1, 2 et 3). Le gène codant pour l'albumine a été utilisé comme marqueur spécifique pour les hépatocytes adultes différenciés, et la GAPDH pour normaliser l'essai. *IFIH1* code pour MDA5 et *DDX58* pour RIG-I.

Ces préparations furent stimulées avec du poly(I :C) extracellulaire (via TLR3/TRIF) ainsi que du poly(I :C) intracellulaire (via MDA5/CARDIF), afin d'élaborer une courbe dose-réponse ainsi qu'une cinétique sur 48 hrs. Le détail de la méthodologie apparaît dans la section « **Material**

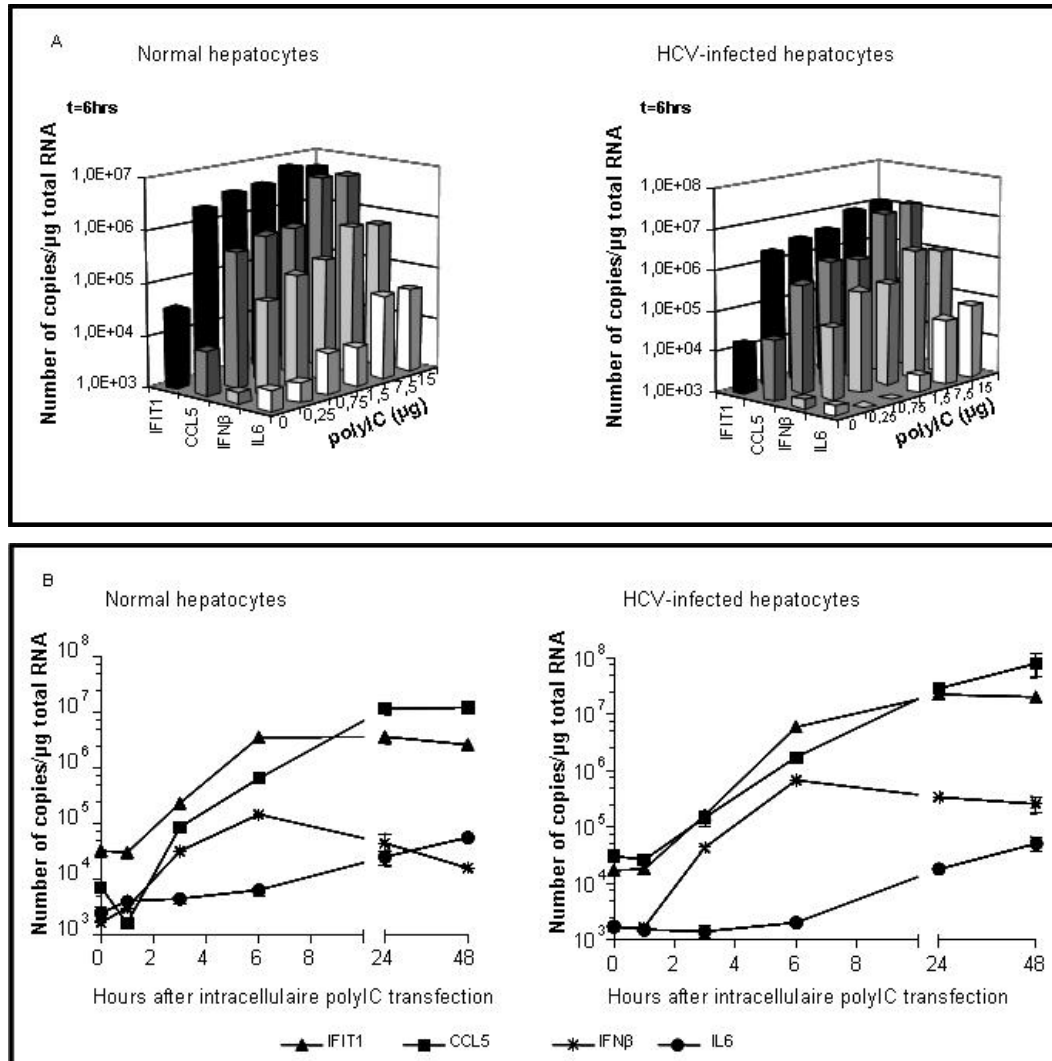
and Methods », Chapitre 2. Comme nous le voyons à la Fig. S3 A et B, les niveaux d'induction des quatre gènes antiviraux-clé obtenus après stimulation avec de l'ARNdb extracellulaire de préparations d'hépatocytes primaires normaux et chroniquement infectés atteignent des niveaux similaires (un exemple représentatif est présenté pour chaque type de préparation). Nous avons fait la même observation avec une stimulation de nos préparations avec de l'ARNdb intracellulaire (Fig. S4 A et B). Les voies de détection de l'ARNdb extra et intracellulaire sont donc fonctionnelles dans des hépatocytes primaires chroniquement infectés avec le VHC isolés de biopsies de foies et mis en culture.





**Figure S3 :** Fonctionnalité de la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire dans des hépatocytes primaires humains normaux et chroniquement infectés avec le VHC

Des préparations d'hépatocytes primaires humains normaux (gauche) et chroniquement infectés avec le VHC (droite) ont été traités avec différentes quantités de poly(I:C) ajoutées directement dans le milieu et différents temps de stimulation. Les ARNm codant pour *IFIT1* (ISG56), *CCL5* (RANTES), *IFNβ* et *IL6* ont été déterminés par PCR quantitatif. Les valeurs sont en nombre absolu de copies par μg d'ARN normalisé sur les valeurs de β-actine pour chaque échantillon. (A) Des valeurs croissantes de poly(I:C) ont été ajoutées au milieu de culture (de 0 à 50 μg/ml) pour une durée totale de stimulation de 3 hrs dans les graphiques du haut et de 6 hrs dans les graphiques du bas. (B) Du poly(I:C) à 5 μg/ml a été ajouté au milieu de culture pour les différents temps de stimulation (indiqués sur l'axe des abscisses) dans des préparations d'hépatocytes primaires normaux (gauche) ou chroniquement infectés avec le VHC (droite). Ces expériences ont été conduites dans plusieurs préparations d'hépatocytes normaux et chroniquement infectés avec le VHC. Les données obtenues pour une expérience représentative sont présentées ici.



**Figure S4 :** Fonctionnalité de la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire dans des hépatocytes primaires humains normaux et chroniquement infectés avec le VHC

Des préparations d'hépatocytes primaires humains normaux (gauche) et chroniquement infectés avec le VHC (droite) ont été traités avec différentes quantités de poly(I:C) transfecté et différents temps de stimulation. Les ARNm codant pour *IFIT1* (ISG56), *CCL5* (RANTES), *IFN $\beta$*  et *IL6* ont été déterminés par PCR quantitatif. Les valeurs sont en nombre absolu de copies par  $\mu$ g d'ARN normalisé sur les valeurs de  $\beta$ -actine pour chaque échantillon. (A) Des valeurs croissantes de poly(I:C) ont été transfectées (de 0 à 1.5  $\mu$ g) pour une durée totale de stimulation de 6 hrs. (B) Les préparations d'hépatocytes primaires normales (gauche) et chroniquement infectées avec le VHC ont été transfectées avec 0.75  $\mu$ g de poly(I:C) pour les différents temps de stimulation (indiqués sur l'axe des abscisses). Ces expériences ont été conduites dans plusieurs préparations d'hépatocytes normaux et chroniquement infectés avec le VHC. Les données obtenues pour une expérience représentative sont présentées ici.

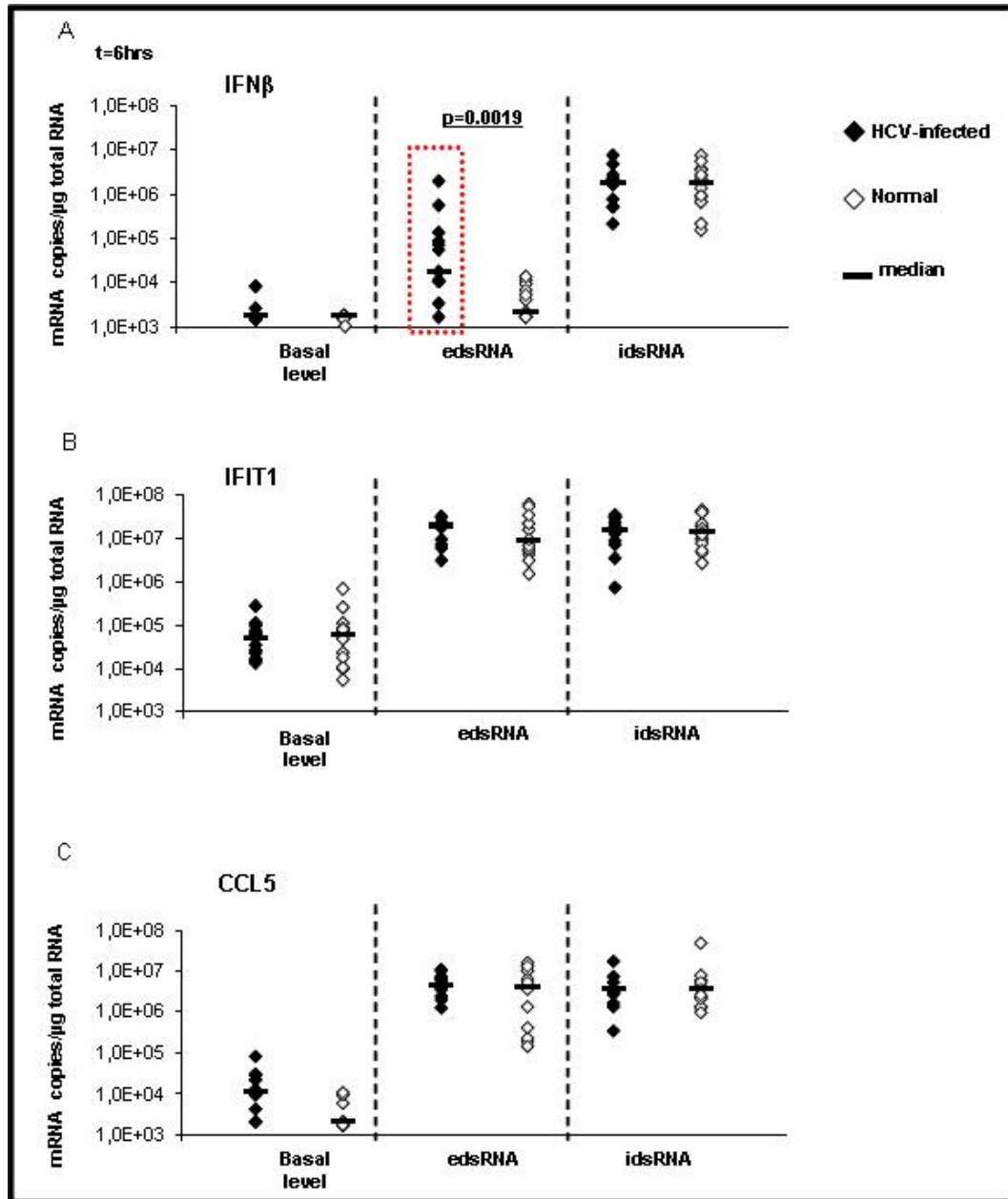
Suite à nos expériences de cinétique et de dose-réponse sur quelques préparations d'hépatocytes primaires chroniquement infectés, nous avons choisi les doses optimales et mené la même étude sur 13 préparations d'hépatocytes primaires chroniquement infectés avec le VHC, ainsi que sur 9 préparations d'hépatocytes normaux (**Fig. S5**). Suite à la mise en culture des hépatocytes primaires fraîchement isolés et leur attachement, nous avons déterminé les niveaux d'expression de



nos trois gènes d'intérêt *IFN $\beta$* , *IFIT1* et *CCL5*, avant de procéder aux stimulations (**Fig. S5**, section gauche). Contrairement à ce que nous avons observé avec les hépatocytes chroniquement infectés avant la mise en culture, nous avons obtenu des niveaux d'expression comparables pour les trois gènes avec les hépatocytes normaux et chroniquement infectés. Rappelons que dans le **Chapitre 4** nous avons observé des niveaux significativement élevés d'*IFIT1* dans les hépatocytes infectés comparés aux normaux.

Suite à la stimulation de la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire, nous avons obtenu des niveaux d'induction comparables pour nos trois gènes *IFN $\beta$* , *IFIT1* et *CCL5* pour les deux types de préparations, normales et chroniquement infectées avec le VHC (voir **Fig. S5**). C'est donc qu'en culture, la fonctionnalité de cette voie est préservée dans des hépatocytes chroniquement infectés avec le VHC. Cette observation, quelque peu contre-intuitive dans la mesure où l'on sait que la voie de détection de l'ARNdb intracellulaire est la voie préférentiellement interférée par NS3/4A, pourrait s'expliquer par des niveaux de NS3/4A trop faibles une fois les cellules mises en culture et donc insuffisants pour interférer significativement avec la voie de signalisation (voir **Fig. S1**).

Pour ce qui est de la réponse antivirale suite à l'exposition des hépatocytes primaires chroniquement infectés avec le VHC à l'ARNdb extracellulaire, il est intéressant de noter que seul l'*IFN $\beta$*  présente un profil d'activation différent entre les préparations d'hépatocytes normaux et chroniquement infectés (voir **Fig. S5**). En effet, nous avons préalablement discuté de la régulation stricte de l'*IFN $\beta$*  dans le cadre de la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire dans des hépatocytes primaires normaux dans lesquels l'*IFN $\beta$*  est induit à 3 hrs de stimulation puis rediminue à des niveaux de base à 6 hrs. Il est donc normal d'obtenir des niveaux de base avec les préparations d'hépatocytes normaux. Néanmoins, comme indiqué dans **Fig. S5**, il existe une hétérogénéité dans les niveaux d'*IFN $\beta$*  dans les hépatocytes primaires chroniquement infectés avec le VHC. Comme discuter dans la section Discussion de la thèse, si les niveaux d'induction d'*IFN $\beta$*  restent soutenus après 3 hrs d'induction dans les hépatocytes chroniquement infectés avec le VHC, c'est qu'il existe peut-être un mécanisme de dérégulation spécifique à ce gène.



**Figure S5 :** Fonctionnalité des voies de détection de l'ARNdb extracellulaire (edsRNA) et intracellulaire (idsRNA) dans des préparations d'hépatocytes primaires humains normaux et chroniquement infectés avec le VHC

Des préparations d'hépatocytes primaires humains chroniquement infectés avec le VHC (◆) et normaux (◇) ont été stimulées avec de l'ARN extracellulaire (edsRNA) (5  $\mu$ g/ml poly(I :C) ajouté au milieu, 6 hrs d'induction) et de l'ARN intracellulaire (idsRNA) (0.75  $\mu$ g poly(I :C) transfecté, 6 hrs d'induction). Les ARNm codant pour *IFN $\beta$* , *IFIT1* (ISG56) et *CCL5* (RANTES) ont été déterminés par PCR quantitatif. Les valeurs sont en nombre absolu de copie par  $\mu$ g d'ARN normalisé sur les valeurs de  $\beta$ -actine pour chaque échantillon. Les niveaux de base correspondent au nombre de copies pour chaque gène avant la stimulation au jour 2 de culture. Chaque condition a été faite en duplicata de puits pour chacune des préparations d'hépatocytes. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le test non-paramétrique de Mann-Whitney U. Une valeur de  $p \leq 0.05$  est considérée significative.

**ANNEXE 2: Article 1 en co-auteur**

**Poly(I :C) and Lipopolysaccharide Innate Sensing Functions of Circulating Human Myeloid Dendritic Cells are affected in Vivo in Hepatitic Virus-infected Patients**

## 1. Mise en contexte et portée

Il est maintenant clairement établi que le récepteur intracellulaire RIG-I est responsable de la détection de l'ARN du VHC dans les cellules infectées. Par ailleurs, nous avons démontré que la réponse antivirale médiée par RIG-I dans des hépatocytes primaires exprimant la protéase NS3/4A est clairement interférée. Toujours dans notre modèle, nous avons démontré que la voie de détection de l'ARNdb extracellulaire dépendante du TLR3 était également ciblée par la protéase virale, mais plutôt dans une voie d'induction des cascades de régulation de l'apoptose, alors que les gènes antiviraux normalement induits ne sont quasiment pas interférés. Cela dit, il existe encore un véritable débat concernant la participation du TLR3 dans la reconnaissance du VHC, même si ce n'est peut-être pas le cas dans les hépatocytes primaires. En effet, les travaux de Rodrigue-Gervais et al. au sein de notre laboratoire ont permis de démontrer que dans les cellules dendritiques mDCs, l'implication de la voie de signalisation médiée par le TLR3 et l'effet de la protéase NS3/4A sont loin d'être négligeables.

Il a été clairement démontré que l'activation des cellules T CD4+ est diminuée chez les patients virémiques (Auffermann-Gretzinger et al., 2001; Kanto et al., 2004; Tsubouchi et al., 2004). Par ailleurs, le rôle des mDCs (cellules myéloïdes dendritiques) est particulièrement intéressant dans la mesure où ces cellules présentatrices d'antigènes périphériques jouent un rôle fondamental de liaison entre l'immunité innée et adaptative (Iwasaki et Medzhitov, 2004). Or ces cellules expriment des niveaux élevés de TLR3, 4 et 7 afin de détecter des PAMPs viraux. De plus, une étude a rapporté une production réduite d'IL12 suite à la stimulation du TLR3 dans le contexte d'une infection chronique avec le VHC, corrélant avec une fréquence diminuée de cellules T CD4+. Dans ce contexte, il a été rapporté qu'un défaut de signalisation de la voie TLR3 au cours d'une infection avec le VHC était en cours dans les mDCs (Anthony et al., 2004).

Dans l'article qui suit, Rodrigue et al. rapportent l'atténuation du potentiel de réponse du TLR3 au poly(I:C) et du TLR4 au LPS dans une petite proportion de cellules MDCs obtenues de patients virémiques dans lesquelles la présence d'ARN viral a été mise en évidence. Ainsi, une association entre la présence d'ARN viral dans les mDCs et la perte de fonction de ces cellules en terme de réponse au signal de danger a donc pu être clairement établie. Bien que les bases moléculaires par lesquelles les mDCs ne répondent plus au signal de danger au cours d'une infection avec le VHC restent encore peu claires, l'atténuation du potentiel de synthèse de cytokines par les DCs résulte d'une activité de subversion de la voie de signalisation du TLR3. Ainsi, les défauts de signalisation dans les mDCs qui jouent un rôle-clé dans l'immunité innée et qui ouvre la

porte à l'immunité acquise induits par le VHC et d'autres virus en général pourraient expliquer en partie le concept de chronicité et la possibilité d'une coexistence prolongée entre hôte et parasite.

## **2. Contributions de la candidate**

Dans ce travail, la candidate a contribué à la mise en place d'un protocole de détection de l'ARN du VHC et a déterminé les charges virales dans les différentes sous-populations de cellules immunitaires circulantes du sang . Afin d'optimiser la spécificité de la détection, nous avons développé un système de quantification de l'ARN du VHC par FRET, basé sur l'hybridation de deux sondes marquées au niveau de la région conservée de l'IRES en région 5' terminale pour couvrir le maximum de génotypes, cette région étant hautement conservée. De plus, afin d'obtenir un signal quantifiable, deux amplifications étaient nécessaires, une première de 18 cycles avec des amorces dites externes, et la seconde amplifiant un fragment contenu dans le produit de la première amplification avec des amorces dites internes et comportant 40 cycles d'amplification. Par ailleurs, le fait d'utiliser un nested-PCR (PCR niché) nous a permis d'augmenter significativement notre sensibilité de détection, tout en conservant un essai très spécifique et stringent puisque nous pouvions détecter aussi peu que 100 copies d'ARN viral par million de cellules.

Les résultats obtenus ont permis entre autre de détecter une très faible quantité d'ARN viral dans les cellules CD3+ périphériques, indiquant donc que les cellules T ne constituent pas un groupe de cellules directement ciblé par le VHC, même s'ils présentent un défaut lorsque l'on regarde la réponse globale au VHC. Par contre, de hauts niveaux d'ARN viral ont été détectés dans les monocytes CD14+, les cellules B et particulièrement dans les DCs. Fait important, il n'existe aucune corrélation entre la charge virale sérique et les niveaux d'ARN viraux par cellule, ce qui va à l'encontre de la théorie d'absorption passive des particules virales dans les phagocytes mononucléaires sanguins.

## **3. Article**

## Poly(I:C) and Lipopolysaccharide Innate Sensing Functions of Circulating Human Myeloid Dendritic Cells Are Affected In Vivo in Hepatitis C Virus-Infected Patients<sup>†</sup>

Ian Gaël Rodrigue-Gervais,<sup>1,2,3</sup> Loubna Jouan,<sup>1,5</sup> Geneviève Beaulé,<sup>1,3</sup> Dominique Sauvé,<sup>1,3</sup> Julie Bruneau,<sup>1,4</sup> Bernard Willems,<sup>1,5</sup> Rafick-Pierre Sékaly,<sup>1,2,3</sup> and Daniel Lamarre<sup>1,2,5,6\*</sup>

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal<sup>1</sup> and INSERM U743,<sup>2</sup> Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada H2X 1P1, and Département de Microbiologie et Immunologie,<sup>3</sup> Département de Médecine Familiale,<sup>4</sup> Département de Médecine,<sup>5</sup> and Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie,<sup>6</sup> Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Received 11 August 2006/Accepted 11 March 2007

**The role of peripheral dendritic cells (DCs) in hepatitis C virus (HCV) infection is unclear. To determine if persistent infection exerts an inhibitory pressure on HCV-specific innate responses, we analyzed DC function in blood through quantification of cell-associated HCV RNA levels in conjunction with multiparametric flow cytometry analysis of pathogen recognition receptor-induced cytokine expression. Independently of the serum viral load, fluorescence-activated cell sorter-purified total DCs had a wide range of cell-associated HCV genomic RNA copy numbers (mean log<sub>10</sub>, 5.0 per 10<sup>6</sup> cells; range, 4.3 to 5.8). Here we report that for viremic patients with high viral loads in their total DCs, the myeloid DC (MDC) subset displayed impaired expression of interleukin-12 (IL-12) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) but normal IL-6 or chemokine CCL3 expression in response to poly(I:C) and lipopolysaccharide (LPS). IL-6-expressing cells from this subgroup of viremic patients demonstrated a significant increase (sixfold more) in TNF-α<sup>+</sup> IL-12<sup>+</sup> cell frequency compared to healthy donors (mean, 38.8% versus 6.5%; *P* < 0.0001), indicating a functional defect in a subpopulation of cytokine-producing MDCs (~6% of MDCs). Attenuation of poly(I:C) and LPS innate sensing was HCV RNA density dependent and did not correlate with viremia or deficits in circulating MDC frequencies in HCV-infected patients. Monocytes from these patients were functionally intact, responding normally on a per-cell basis following stimulation, independent of cell-associated HCV RNA levels. Taken together, these data indicate that detection of HCV genomic RNA in DCs and loss of function in the danger signal responsiveness of a small proportion of DCs in vivo are interrelated rather than independent phenomena.**

Hepatitis C virus (HCV) chronic infectious disease is proving to be a public health problem of growing importance. The inadequacy and loss of HCV-specific CD4<sup>+</sup> T-cell help are widely perceived as the principal factors responsible for the failure of CD8<sup>+</sup> T cells to afford protection against the highly mutable HCV genome (13, 41). Nonetheless, the precise mechanisms operating within the host which result in the failure of CD4<sup>+</sup> T-cell immunity and allow HCV to establish persistent infection have remained enigmatic (38). In this regard, the role of CD11c<sup>hi</sup> myeloid dendritic cells (MDCs) is of interest because these peripheral antigen-presenting cells display extraordinary capacities to link innate and adaptive immunity (18). Indeed, diphtheria toxin-based in vivo depletion of CD11c<sup>+</sup> DCs abrogates priming of T cells in response to infectious pathogens in otherwise immunocompetent mice (19). Despite careful execution of experiments, the exact contribution of MDCs to any individual aspect of HCV immunity remains controversial.

It has been reported that CD4<sup>+</sup> T-cell activation (allogeneic

responses) is decreased in HCV-viremic patients (3, 21, 42). This is corrected upon clearance of cell-associated viral RNA from MDCs after 4 weeks of ribavirin/alpha interferon (IFN-α) antiviral therapy (43), indicating that weak HCV-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses are perhaps due to defects in DC-mediated innate immune functions. In contrast, other observations (26) have been taken to indicate that the deficiency in HCV-specific CD4<sup>+</sup> T-cell activity is not attributable to virus-induced dysfunctions in these cells or their precursors (DC independent), even though DC-derived signals may be essential for the T-cell activation function itself. Accordingly, the use of in vitro cytokine-driven culture systems for chronic infection is reported to result in functionally intact CD14<sup>+</sup> monocyte-derived DCs (albeit to various degrees in different studies) (24, 26, 32, 35). However, it has remained equally likely that the DC population in question was generated from nondefective precursors in the in vitro system, as these studies demonstrated the potential for functional DC development from monocytes rather than the existence of functional DC subsets in the periphery. The seemingly paradoxical conclusions drawn from those observations highlight the importance of carrying out functional measurements on cells with minimal manipulation. Most of the relevant studies presumed an equivalent function of the peripheral counterparts, a hypothesis supported by data showing that tumor necrosis factor alpha

\* Corresponding author. Mailing address: Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Saint-Luc, 264 Boul. René-Lévesque Est, Rm. EA-312, Montréal, Québec, Canada H2X 1P1. Phone: (514) 890-8000, ext. 35258. Fax: (514) 412-7314. [REDACTED]

<sup>†</sup> Published ahead of print on 21 March 2007.

TABLE 1. Clinical and demographic characteristics of HCV-infected patients<sup>a</sup>

Patient (n = 18)	Age (yr)/sex	HCV genotype	Viremia <sup>a</sup> (IU ml <sup>-1</sup> )	Therapy	Outcome	Presence of HCV RNA <sup>b</sup>		% MDCs <sup>c</sup>	Group <sup>d</sup>	
						PBMCs	DCs <sup>e</sup>			
P06	42/M	1a	216,000	None	CH	+	5.02	0.33	CP-D	
P18	24/M	1a	284,000	None	CH	+	4.95	0.11	NA	
P19	39/M	1a	90,300	None	CH	+	4.97	0.10	NA	
P20	30/M	1a	1,400,000	None	CH	+	5.09	0.14	CP-D	
P23	52/F	1	348,000	Riba+pIFN- $\alpha$	NR	+	5.15	0.25	CP-D	
P24	50/M	1	5,495,409	Riba+pIFN- $\alpha$	NR	-	<4.35 <sup>f</sup>	NA	CP-N	
P25	20/M	1	1,148,154	Riba+pIFN- $\alpha$	NR	-	<4.35 <sup>f</sup>	NA	CP-N	
P26	47/M	1	2,884,032	Riba+pIFN- $\alpha$	NR	+	NA	NA	CP-D	
P27	25/M	1	2,344,228	Riba+pIFN- $\alpha$	NR	NA	NA	NA	CP-N	
P28	46/M	1b	4,940,000	Riba+pIFN- $\alpha$	NR	+	4.42	0.56	CP-N	
P29	59/F	1	2,880,000	Riba+pIFN- $\alpha$	NR	+	5.30	0.23	CP-D	
P30	49/M	1	809,000	IFN- $\alpha$	NR	+	5.80	0.16	CP-D	
P31	49/M	1	$\leq 50$	None	SR	+	4.26	0.19	CP-N	
P32	43/F	1	3,690,000	None	CH	+	5.80	0.21	CP-D	
P33	33/F	1	3,410,000	None	CH	+	4.53	0.17	CP-N	
P34	74/M	1	282,000	None	CH	+	NA	0.32	CP-N	
P35	49/M	1	$\leq 50$	Riba+pIFN- $\alpha$	SVR	-	<4.47 <sup>f</sup>	0.28	CP-N	
P37	48/M	1	NA	Riba+pIFN- $\alpha$	NR	+	(14/17 [82%])	4.91	NA	CP-D

<sup>a</sup> Measured with Cobas Amplicor HCV Monitor test v2.0 at the time of collection of blood samples.

<sup>b</sup> Measured with a nested real-time qRT-PCR using hybridization probes on a LightCycler instrument. +, detected; -, below detection threshold (<100 HCV sense-strand copies per 10<sup>6</sup> cells). DC data are log<sub>10</sub> (10<sup>-6</sup>) FACS-obtained total DCs (MHC-II<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup>).

<sup>c</sup> Frequency of CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD123<sup>dim</sup> CD62L<sup>+</sup> HLA-DR<sup>br</sup> MDCs in blood.

<sup>d</sup> Clinical subgroups of patients were identified based on MDC functionality (see Fig. 2).

<sup>e</sup> Abbreviations: M, male; F, female; IFN- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  monotherapy; Riba+pIFN- $\alpha$ , ribavirin and pegylated IFN- $\alpha$  combined therapy; CH, chronic infection; NR, no response; SR, spontaneous resolution; SVR, sustained viral response; NA, not available.

<sup>f</sup> \*, maximum possible HCV RNA abundance estimate based on DC frequency (MDCs + PDCs), assuming that <100 copies per 10<sup>6</sup> PBMCs (below detection threshold) are concentrated in blood DCs. The estimate is given as log<sub>10</sub>(100 HCV molecules/% DCs in PBMCs). The average (0.45%) for cluster group CP-N was used for P24 and P25.

(TNF- $\alpha$ )-activated MDCs from viremic patients are functionally competent, with a CD4<sup>+</sup> T-cell clonal expansion capacity equal to that of healthy donors (27). While that finding indicates that TNF receptor signaling is not affected in peripheral MDCs, the extent of activation of these cells in response to multiple innate inputs known to relay distinct danger signals (e.g., Toll-like receptors [TLRs]) remained unexplored.

In vivo, the requirement that DCs directly recognize a pathogen-specific molecule to effectively induce the efferent functions of helper CD4<sup>+</sup> T cells after activation cannot be replaced by inflammatory cytokines (e.g., TNF- $\alpha$ ) (39). TLR3, -7, and -8 expressed on MDCs act principally as viral sensors, recognizing, in a replication-independent way, conserved molecular motifs in virus genomic RNA (1, 14, 23). The signals that originate from these TLR sensors are those required to drive antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-helper-cell differentiation in vivo (31, 36, 37, 45). Recently, one study reported that reduced TLR3-induced interleukin-12 (IL-12) production correlated with lower frequencies of HCV-specific CD4<sup>+</sup> T-cell help in viremic patients (2). Notably, HCV NS3/4A serine protease can function as an antagonist of TLR3-dependent innate sensing through its ability to specifically target its signaling adaptor, TRIF, for proteolytic cleavage (25). Inhibition of this protease activity enables host recognition of HCV RNA (9, 40). Loss of TLR3 sensing, as reported by Anthony et al. (2), may therefore relate to the ability of HCV to physically interact with MDCs and cause disruptions of TLR-mediated innate recognition of HCV components in these cells. However, in vivo data substantiating this view are scarce, as the function of TLRs in innate immunity with respect to HCV has not been studied extensively.

For this study, we took advantage of a sensitive and precise multiparametric flow cytometry assay based on the induction of intracellular cytokines after very short-term (6-hour) stimulation of Golgi transport-inhibited DCs with TLR agonists and readdressed the question of whether innate functions of MDCs are intact in HCV-positive subjects. We report the attenuation of poly(I:C) (TLR3) and lipopolysaccharide (LPS) (TLR4) innate sensing potential in a small proportion of CD14<sup>-</sup> CD33<sup>+</sup> major histocompatibility complex class II-bright (MHC-II<sup>br</sup>) cytokine-producing MDCs from viremic patients, as long as the total DCs in those patients contained high levels of cell-associated HCV genomic RNA ( $\geq 5.0$  log<sub>10</sub> copies per 10<sup>6</sup> cells). These results provide the first clear evidence of an association between HCV and a loss of function of the danger signal responsiveness of MDCs in the presence of ongoing viremia.

(This work was carried out as partial fulfillment of I. G. Rodrigue-Gervais' Ph.D. thesis at the Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.)

#### MATERIALS AND METHODS

**Patients and control individuals.** Blood samples were obtained from 18 HCV-infected patients enrolled in the drug addiction cohort and the hepatology experimental unit of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Hôpital Saint-Luc. The clinical and demographic characteristics of the patients studied are shown in Table 1. Antiviral therapy had been discontinued at least 1 year prior to sample collection. Clinical protocols conformed to the ethical guidelines of our institutions. Samples were obtained with the informed consent of the subjects.

**Primary cell isolation, cell culture, and cell stimulation.** Peripheral blood was collected in heparin preparation tubes (Vacutainer; Becton Dickinson, Franklin, NJ). Fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by

TABLE 2. Oligonucleotides used for real-time RT-PCR quantification

Primer or probe	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>
<b>PCR primers</b>	
HCV-out5	CGTCTAGCCATGGCGTTAGTA
HCV-out3	CGGTTGGTGTTCITTTGGTT
HCV-in5	TCTGCGGAACCGGTGAGTA
HCV-in3	CAAGCACCTATCAGGCAGTA
GAPDH-out5	GGTCGGAGTCAACGGATT
GAPDH-out3	GCCATCACGCCACAGTT
GAPDH-in5	TTCCATGGCACCGTCAA
GAPDH-in3	GTCCTTCCACGATACAAA
Strand-tag	GCTCATGGTGCGGAATAA
<b>LightCycler hybridization probes</b>	
HCV-P1	ATTTGGGCGTGCCCCGCAAGAf
HCV-P2	XCTAGCCGAGTAGTGTGGTCCGCGAAAGGCP
GAPDH-P1	GCTCCTGGAAGATGGTGATGGGATTf
GAPDH-P2	XCCATTGATGACAAAGCTTCCCCTTCTCP

<sup>a</sup> f, fluorescein acceptor; p, 3' phosphate blocking group.

Ficoll-Paque density gradient centrifugation, and cultures were performed as described previously (15). In brief, PBMCs were seeded in 75-cm<sup>2</sup> culture flasks at a concentration of  $10 \times 10^6$  cells per ml, cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, and used within 12 to 16 h of isolation for all stimulations and sorting experiments. PBMCs were stained with directly conjugated anti-CD19-fluorescein isothiocyanate (anti-CD19-FITC) (HIB19), anti-HLA-DR-peridinin chlorophyll protein (PerCP) (L243; MHC-II), anti-CD3-allophycocyanin (anti-CD3-APC) (UCHL1), and anti-CD14-APC-Cy7 (MφP9) cell surface antibodies from BD Pharmingen and then sorted. In cell sorting experiments, about  $1 \times 10^6$  blood CD3<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> MHC-II<sup>+</sup> DCs were sorted from  $1 \times 10^8$  cells on a FACSaria flow cytometer, using Diva v4.0 software (Beckton Dickinson, La Jolla, CA). Subpopulation purity was always above 99%. For cytokine production experiments, cells were stimulated for 6 h at 37°C in 96-well U-bottomed deep-well plates ( $1.25 \times 10^6$  cells per well) with either 0.1 µg/ml LPS (*Escherichia coli* O55:B5; Sigma-Aldrich) or 25 µg/ml poly(I:C) (Amersham Biosciences) (final concentrations), and the secretion inhibitor brefeldin A (10 µg/ml; Sigma-Aldrich) was added for intracellular cytokine detection in the last 5 h of stimulation. Control conditions included the absence of agonists (medium alone) to control for spontaneous, non-agonist-specific cytokine synthesis. In some experiments, healthy donor PBMCs were stimulated in the presence of SB202190 (10 µM) to impose a blockade of p38 mitogen-activated protein kinase activity (see Fig. 2).

**Flow cytometry.** Surface and intracellular staining was done using directly conjugated antibodies and Cascade Yellow-streptavidin (Molecular Probes) according to standard techniques. The following antibodies were used: anti-CD3-phycoerythrin-Cy7 (anti-CD3-PE-Cy7) (SK7), anti-CD4-APC-Cy7 (RPAT4), anti-CD11c-APC (B-ly6), anti-CD14-FITC (M5E2), anti-CD14-PE (M5E2), anti-CD16-FITC (3G8), anti-CD19-PE-Cy7 (SJ25C1), anti-CD33-PerCP-Cy5.5 (P67.6), anti-CD123-PE-Cy5.5 (9F5), anti-HLA-DR-biotin (L243), anti-HLA-DR-APC-Cy7 (L243), anti-IL-6-PE (MQ2-6A3), anti-CCL3-PE (11A3), anti-IL-12 p40/70-APC (C11.5), anti-TNF-α-PE-Cy7 (Mab11) (all from BD Pharmingen), anti-CD62L-phycoerythrin Texas Red (ECD) (DREG56) (Immunotech), and anti-CD303-FITC (AC144) (Miltenyi Biotec). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) data were acquired on an LSRII flow cytometer, using FACS Diva v4.0 software. A minimum of  $1 \times 10^6$  events in the live-cell gate, as defined by forward and side scatter, were accumulated for each sample, in duplicate. MDCs appear as a uniform cluster of CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> HLA-DR (MHC-II)<sup>+</sup> cells, allowing them to be distinguished from monocytes and lymphocytes. Responses to stimuli were considered positive if the frequency of IL-6 cytokine-producing MDCs was three or more times the frequency in medium alone. Cytokine clustering analysis was done as described previously (17) by inputting the log<sub>2</sub> ratio of mean fluorescence intensity (MFI) values for intracellular FACS staining positive events ( $MFI^{stimulated}/MFI^{unstimulated}$ ) into MeV array software (<http://www.tigr.org/software/tm4/mev.html>). For these clustering analyses, protein expression in the CD14<sup>-</sup> CD33<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> MDC population from HCV patients treated with stimuli was presented as the log<sub>2</sub> change versus protein expression in the MDC population from healthy donors.

**HCV RNA quantification.** Primers specific for the 5'-untranslated region of HCV and the human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene (Table 2) were defined for the strain H77 and human sequences (GenBank accession numbers AF011751 and BC020308, respectively). The amplicon for

HCV, defined by the HCV 5'/3'-out primers and amplified from the p90/HCV FL-long plasmid, was cloned into the pCR2.1 Topo vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) together with the GAPDH amplification product (amplified from human lymphocyte RNA by using the GAPDH 3'/5'-out primer pair). This plasmid was used to generate standard curves for a real-time quantitative PCR-based assay. Quantification was performed with LightCycler hybridization probe technology (Roche Diagnostics Systems, Somerville, NJ). Cellular RNAs were extracted using RNeasy Mini columns (QIAGEN, Valencia, CA) per the manufacturer's instructions and were reverse transcribed for 30 min using Omniscript reverse transcriptase (QIAGEN). After reverse transcription (RT), PCR amplification was performed (5 min of initial denaturation at 95°C, followed by 45 s at 94°C, 60 s at 60°C, and 2 min at 72°C for 20 cycles) using the outer 3'/5' primer pairs. The linearity of this first-round assay was demonstrated in duplicate experiments of up to 20 cycles, using a maximum of 1 µg of Huh7 clone 9-13 replicon RNA (unpublished data). These PCR conditions were used for all subsequent experiments. PCR conditions in the LightCycler experiments, performed with 1/10 of the initial PCR product, were as follows: 60 s of initial denaturation at 95°C, followed by 1 s at 95°C, 10 s at 60°C, and 15 s at 72°C for 40 cycles. Fluorescence measurements were performed at the end of the annealing steps. An HCV RNA replicon calibrator synthesized from plasmid pHCRepAB12 with a T7-Mega-script in vitro transcription kit (Ambion, Austin, TX) was used in all experimental runs. This highly sensitive nested quantitative RT-PCR (qRT-PCR) assay allows the detection of  $\geq 100$  HCV sense-strand copies per  $10^6$  cells. HCV was quantified in duplicate at the RT level for all studied samples. Healthy blood donors routinely tested in all experimental runs failed to give detectable signals for HCV RNA.

**Statistics.** Statistical analysis was performed using the Vassar website (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>) and the GraphPad Prism v3.0 statistical software package. All tests were two-tailed, and *P* values of <0.05 were considered significant.

## RESULTS

**Circulating total DCs from viremic patients contain genomic viral RNAs.** In trying to relate virus-induced loss of function with anomalies in innate sensing pathways of peripheral DCs, we first explored the nature of the immune subsets that interact with HCV and act as potential targets for this virus in vivo. PBMCs with measurable HCV RNA from viremic patients were sorted into T cells, B cells, monocytes, and total DCs by four-color flow cytometry ( $n = 9$ ) and subjected to a real-time qRT-PCR assay ( $\geq 100$  copies/ $10^6$  cells) that allowed for accurate quantification of sense-strand HCV RNA molecules in peripheral leukocytes from infected patients (Fig. 1). Quantification of cell-associated viral RNA loads in sorted leukocytes confirmed that HCV genomic RNA is detectable within CD19<sup>+</sup> B lymphocytes (mean log<sub>10</sub> value, 4.7 per  $10^6$  cells; range, 3.6 to 5.5). We found a significantly lower HCV RNA level in peripheral CD3<sup>+</sup> T cells than in all other peripheral subpopulations analyzed (one-way analysis of variance [ANOVA];  $P < 0.0001$ ), supporting the notion that T cells do not constitute a preferential viral interaction partner in vivo. Detection of viral RNA in peripheral DCs was consistent with other findings showing that this cellular compartment unambiguously interacts with HCV (12, 42, 43). Surprisingly, however, CD3<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> MHC-II<sup>+</sup> total DCs had high cell-associated viral loads (mean log<sub>10</sub> value, 5.2 per  $10^6$  cells; range, 4.4 to 5.8). In contrast to the case in a previous study (5), CD14<sup>+</sup> monocytes were unusually positive for HCV RNA (mean log<sub>10</sub> value, 4.6 per  $10^6$  cells; range, 4.1 to 5.4), with levels very similar to those of B cells but significantly lower than those of total DCs in a pairwise comparison (Student's correlated *t* test;  $P = 0.005$ ). No correlation existed between the serum viral load (ranging from 4.9 to 6.7 log<sub>10</sub> IU ml<sup>-1</sup>) (Table 1) and HCV genomic RNA level per cell in FACS-



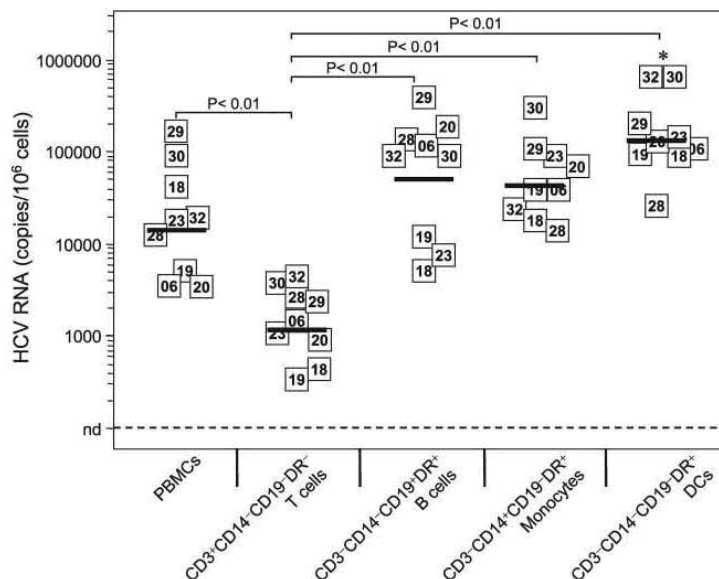


FIG. 1. HCV RNA contents in circulating immune blood cell subpopulations from viremic patients. HCV sense-strand RNA copy numbers in FACS-purified blood T cells ( $CD3^+$ ), B cells ( $CD19^+$ ), monocytes ( $CD14^+$ ), and total DCs ( $CD3^+ CD14^- CD19^- HLA-DR^+$ ) from nine viremic patients were quantified by LightCycler hybridization probe technology. The data are the averaged values for replicates from two independent measurements expressed as absolute numbers of HCV RNA molecules per  $10^6$  cells. Each square indicates the detection of viral RNA from a patient, with the corresponding identification number inside the square. The solid horizontal lines represent the average for each group. Differences between T cells and other subsets, as calculated by one-way ANOVA with Tukey's test, are shown above the graph. \*,  $P < 0.01$  for DCs versus PBMCs.

examined total DCs or monocytes (data not shown), arguing against passive plasma viral particle adsorption into mononuclear blood phagocytes as the source of the detected viral RNA. Consequently, we have used the quantitative detection of genomic HCV RNA as a reliable surrogate marker of a specific interaction between the virus and DCs, not as one of actual infection, in the following experiments. The consistent presence of genomic HCV RNA and its high content within total DCs indicate that these cells are targets of HCV in the periphery, with the potential to constitute an immunologically relevant host if this interaction was associated with dampened activation of the innate immune response in viremic patients.

**MDCs display impaired expression of IL-12 and TNF- $\alpha$ , but not IL-6 or CCL3, in response to poly(I:C) and LPS in viremic patients.** Next, we tested the hypothesis that the association of HCV with DCs *in vivo* would lead these cells to react to poly(I:C) and LPS in an inappropriate or sensitized manner in HCV-viremic patients and would be related to disease progression. PBMC samples from 14 HCV-viremic and 2 aviremic clinical responders ( $n = 16$ ) were used to survey, by intracellular flow cytometry, the innate sensing potentials of MDCs and monocytes by exposing cells to stimuli and measuring downstream cytokine signatures at the single-cell level. We computed FACS cytokine expression levels [ $\log_2(MFI^{stimulated}/MFI^{unstimulated})$ ] and built a heat map indicating the  $\log_2$  changes in IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , and CCL3 protein expression profiles for  $CD14^- CD33^+ MHC-II^b+$  patient MDCs treated with poly(I:C) or LPS versus protein expression in the MDC population from age-matched healthy donors ( $n = 7$ ) (Fig.

2A). Each square in the grid represents, in a color gradient, the expression of one intracellular marker (as measured by the MFI) in response to one stimulus for each patient. Surprisingly, we observed differences in the strengths of the MDC responses between viremic patients after stimulation. As an example, although patients HCV-P28 and HCV-P29 are both viremic nonresponders (Table 1), their MDCs exhibited very different cytokine induction patterns following poly(I:C) and LPS stimulation (Fig. 2A). To understand this dichotomy in responses between viremic patients, we grouped them with unsupervised hierarchical clustering algorithms used in microarray gene expression analysis (as described in Materials and Methods). This approach enabled the investigation of whether the patients with response anomalies showed functional similarities to each other and differed from those with normal responses. By using a cluster analysis, we identified two main groups of viremic patients with key differences in their poly(I:C)- and LPS-induced cytokine expression profiles (Fig. 2A). Each was termed a distinct cytokine profile (CP) cluster based on the primary nature of the response potential of the cluster. CP-defective (CP-D) patients (8 of 16 patients) displayed less cytokine (IL-12 and TNF- $\alpha$ ) expression in response to agonist stimulation than did healthy donors. CP-normal (CP-N) patients (8 of 16 patients) displayed a response potential similar to that of healthy donors. Both IL-12 and TNF- $\alpha$  expression was significantly decreased in CP-D patients compared to that in age-matched healthy donors and CP-N patients (Fig. 2B), indicating that the expression of these two cytokines is jointly affected in viremic patients. Interestingly,

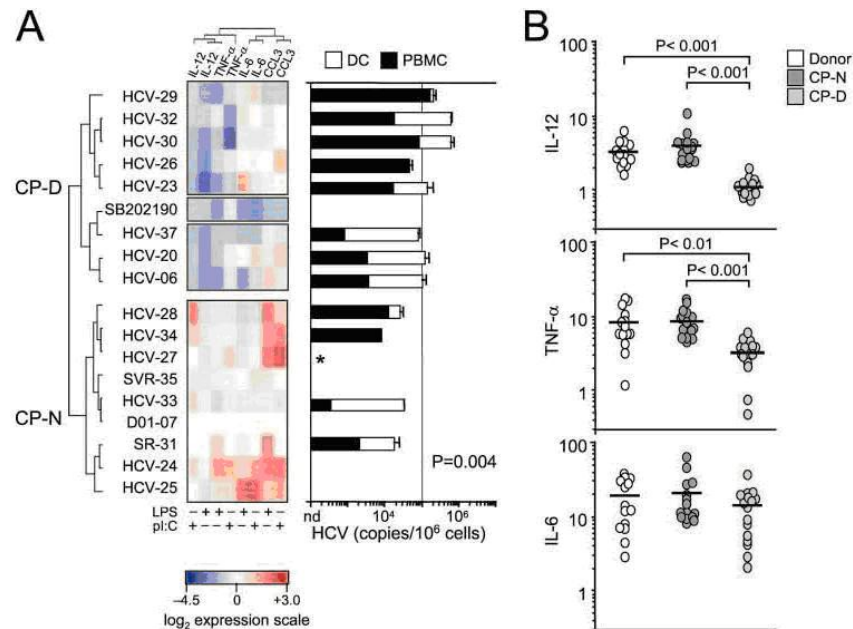


FIG. 2. MDCs display impaired response to poly(I:C) and LPS in viremic patients. PBMCs were cultured for 1 h in the absence or presence of poly(I:C) or LPS before the addition of brefeldin A ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) for a further 5 h. Cells were recovered and stained for the indicated intracellular proteins. (A) (Left) Heat map indicating  $\log_2$  changes in IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , and CCL3 protein expression profiles for  $\text{CD}14^+ \text{CD}33^+ \text{MHC-II}^{\text{br}}$  MDCs from patients, treated with poly(I:C) or LPS for 6 h, versus protein expression in the same population from healthy donors. Expression signatures for 7 healthy blood donors (D01 to D07), 2 responders (SR-P31 and SVR-P35), and 14 viremic (HCV) patients were grouped according to similarity, using the complete linkage hierarchical clustering algorithm in MeV software (left margin). Ratios of the different fluorescent intracellular antibodies (columns) were determined by calculating  $\log_2(\text{MFI}^{\text{stimulated}}/\text{MFI}^{\text{unstimulated}})$  and subtracting healthy donor sample means. Each square in the grid corresponds to a flow cytometry file containing approximately 5,000  $\text{CD}14^+ \text{CD}33^+ \text{MHC-II}^{\text{br}}$  cell events. Protein expression changes relative to healthy donors are indicated by the color intensity scale (red, more expression than that of healthy donors; blue, less expression than that of healthy donors; and white, no change relative to healthy donors). SB202190 ( $10 \mu\text{M}$  for 30 min prior to stimulation) served as a positive control for down-regulation of the analyzed inflammatory mediators. (Right) Association between HCV RNA abundance in PBMCs (black bars), FACS-purified total DCs ( $\text{CD}3^- \text{CD}19^- \text{CD}14^+ \text{MHC-II}^+$ ; white bars), and cytokine expression profiles (CP). The asterisk indicates that HCV quantification was not done due to an unavailability of cell samples. The solid vertical line at  $10^5$  on the x axis represents a reference point. Statistical analysis was done by Fisher's two-tailed exact probability test on DCs ( $P = 0.004$ ). (B) Groupwise comparisons between healthy donors and CP-N and CP-D subjects. IL-12, TNF- $\alpha$ , and IL-6 increases above baseline (x-fold) ( $\text{MFI}^{\text{stimulated}}/\text{MFI}^{\text{unstimulated}}$ ) are shown for each cluster. Combined data for poly(I:C) and LPS responses and averages (solid horizontal lines) are shown. Statistical comparisons between groups were calculated by one-way ANOVA with Tukey's test.

IL-6 and chemokine CCL3 expression levels were not observed to differ in patient subgroups relative to healthy donors and each other (Fig. 2A and B). Notably, aviremic subjects SR-P31 and SVR-P35 exhibited normal cytokine expression and clustered within the CP-N group.

**Attenuation of innate sensing in MDCs is associated with high HCV RNA abundance in total DCs.** The picture that emerges from the unsupervised cluster analysis reveals a role for a virus-dependent loss of function as the cause of the innate sensing dysfunction in MDCs. This is apparent in that 6/9 patients (HCV-P24, -P25, -P33, and -P34, SR-P31, and SVR-P35) with low levels of HCV RNA in PBMCs ( $<10^4$  copies) showed normal poly(I:C)- and LPS-potentiated expression profiles, in contrast to 5/6 patients (HCV-P23, -P26, -P29, -P30, and -P32) for whom poor responses were associated with high cell-associated HCV RNA levels in PBMCs ( $\geq 10^4$  copies) and a CP-D clustering (Fig. 2A, black bars). Similarly, CP-D patients had high levels of HCV RNA in total DCs ( $\geq 10^5$  copies; 6/7 patients) compared to CP-N patients ( $<10^5$  copies; 6/6

patients) (Fig. 2A, white bars, and Table 1). These results demonstrate that in most cases, inhibition of cytokine expression is linked to the level of viral RNA in carrier cells. In fact, Fisher's exact probability test indicated that attenuation of poly(I:C)- and LPS-induced cytokine up-regulation was not independent of the level of HCV RNA copy abundance in total DCs ( $P = 0.004$ ) (Fig. 2A, right panel). Thus, for every CP-D subject, whether naive or a nonresponder, DCs had a 3 to 23 times (mean, 10-fold) higher cell-associated virus content than that in CP-N patients. Furthermore, the abundance of viral RNA quantified in total FACS-examined DCs negatively correlated with poly(I:C)- and LPS-mediated induction of IL-12 and TNF- $\alpha$  in MDCs ( $P = 0.0028$  and  $P = 0.0003$ , respectively) (Fig. 3). Finally, since CP-D patients did not have higher levels of viremia than CP-N patients (mean  $\log_{10}$  value,  $6.1 \pm 0.5$  and  $6.3 \pm 0.5$ , respectively;  $P = 0.37$  by Student's *t* test) (Table 1), it is unlikely that this defect was due to nonspecific plasma viral particle adsorption. Thus, our findings support the idea that emergence of defective MDCs in the periphery is a result of

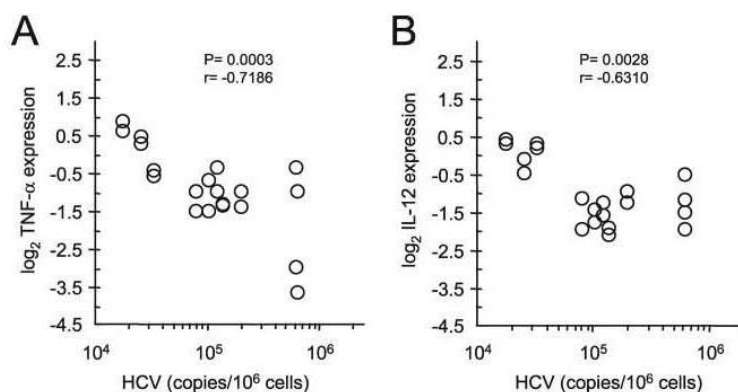


FIG. 3. Poly(I:C) and LPS responsiveness in MDCs is associated with HCV RNA levels in total DCs. Dot plots show TNF- $\alpha$  (A) and IL-12 (B) responses ( $\log_2$ ) as a function of HCV RNA copy numbers in FACS-purified DCs. Data points (two per patient) represent the mean levels of cytokine expression as  $\log_2$  changes versus those of the donors for two independent measurements. A negative correlation was observed for HCV-infected patients between HCV RNA and IL-12 or TNF- $\alpha$  expression ( $n = 10$ ). Correlation statistics were analyzed using the Spearman rank correlation test.

virus-induced dysfunctions rather than the sole consequence of exposure of MDCs to chronic viral disease, as proposed previously (35). They also demonstrate that the cell-associated HCV RNA load in DCs is predictive of TLR responsiveness independent of viremia: DCs containing increasing amounts of HCV RNA are more functionally exhausted in that they are less able to respond to danger stimuli *ex vivo*. Altogether, these data provide evidence that HCV can specifically attenuate danger signal activation of innate immune functions of blood MDCs in viremic patients.

**Selective attenuation of poly(I:C) and LPS innate sensing in a subpopulation of MDCs in viremic patients.** The higher levels of HCV RNA in CP-D patients could be due to a large number of copies in a small number of cells or to a small number of copies in nearly all DCs (of which  $\sim 50\%$  are MDCs). To reconcile the apparent low HCV RNA copy number per DC with the functional defects observed in MDCs (which until now were shown as an absolute level of cytokine expression for the whole MDC population), we analyzed the patterns of IL-12 and TNF- $\alpha$  production at the single-cell level to demonstrate that only a small proportion of the MDC population from these patients is nonfunctional for cytokine production. All patients analyzed consistently displayed approximately equivalent levels of IL-6 expression per cell (Fig. 2B, bottom panel), demonstrating that induction of IL-6 was not inhibited by HCV. In conjunction with the finding that essentially all TNF- $\alpha^+$  IL-12 $^-$ , TNF- $\alpha^-$  IL-12 $^+$ , and TNF- $\alpha^+$  IL-12 $^+$  MDCs expressed IL-6 in healthy donors (data not shown), these observations indicated that IL-6 acts as a key molecular marker of cells activated to produce cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-12), making this a traceable subset in defective patients, and that such an analysis should not lead to missed HCV-caused MDC dysfunctions.

Direct *ex vivo* analysis of CD14 $^-$  CD33 $^+$  MHC-II $^{b*}$  IL-6 $^+$  MDC responsiveness to poly(I:C) and LPS revealed striking differences at the single-cell level for the patients tested that confirmed the MFI results shown in Fig. 2. Figure 4 illustrates these different patterns in two-dimensional contour plots of the

expression of IL-12 and TNF- $\alpha$  for two representative patients after gating on IL-6 $^+$  MDCs ( $\sim 30\%$  of MDCs). Similar to the case for healthy donors, poly(I:C) and LPS stimulated both high IL-12 and TNF- $\alpha$  expression in MDCs from patient HCV-P28 (CP-N), and high dual production took place simultaneously in individual cells (Fig. 4A, bottom row). Conversely, patient HCV-P29 (CP-D) demonstrated a loss of cytokine-secreting effectors with both agonists (13.5-fold more TNF- $\alpha^-$  IL-12 $^-$  cells than those of patient HCV-P28). This resulted in a lower expression output at the single-cell level, as indicated by the diminished fluorescence intensity shift in both intracellular cytokines (Fig. 4A, gray arrows). This observation applied to the majority of the patients: CP-D patients exhibited sixfold higher frequencies of TNF- $\alpha^-$  IL-12 $^-$  cells than did CP-N patients (38.8% versus 6.5%;  $P < 0.0001$  by Mann-Whitney U test) (Fig. 4C). This increase in doubly negative effectors paralleled a significant decrease in TNF- $\alpha^+$  IL-12 $^+$  cell frequency (fourfold less) in the CP-D subgroup compared to that for CP-N patients (mean, 6.3% versus 25.7%;  $P = 0.0003$ ) (Fig. 4C), indicating that a subpopulation of cytokine-producing MDCs ( $\sim 6\%$  of MDCs) in the CP-D subgroup of patients expressed abnormal levels of TNF- $\alpha$  and IL-12 following poly(I:C) or LPS stimulation. In contrast, LPS-activated CD14 $^+$  CD33 $^+$  MHC-II $^+$  IL-6 $^+$  monocytes had essentially identical expression of TNF- $\alpha$  and IL-12 on a per-cell basis for all patients analyzed (Fig. 4A, rightmost panels, and data not shown), challenging the idea that nonspecific interactions with HCV or TLR-mediated chronic stimulation *in vivo* (7) is the underlying cause for the loss of function in the responsiveness of the MDCs. Thus, defective production of cytokines at the single-cell level is confined to a small population of responding MDCs ( $\sim 3\%$  of total DCs, defined as IL-6 $^+$ ), appears to be cell type specific, and is a selective process restricted among viremic patients (Fig. 2). Furthermore, this analysis highlights that limited functionality is observed in only 6% of MDCs and is not a generalized characteristic of all MDCs in affected viremic patients.

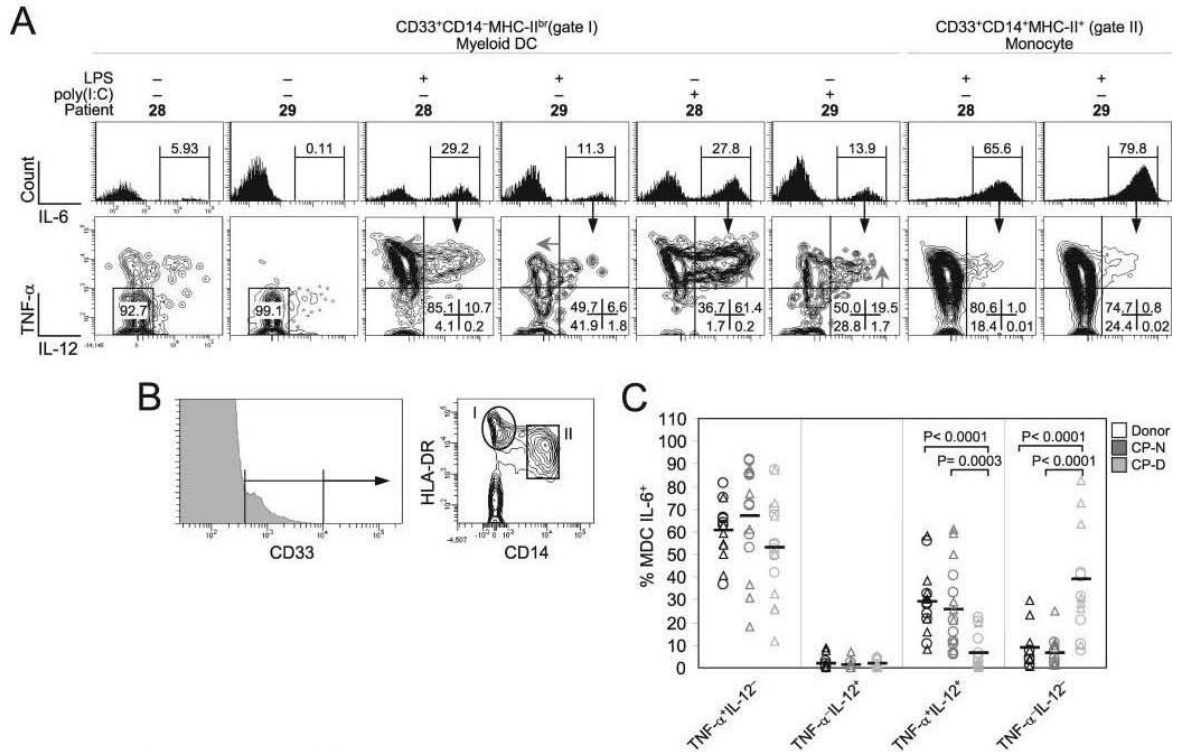


FIG. 4. Selective attenuation of poly(I:C) and LPS innate sensing in IL-6-expressing MDCs of CP-D viremic patients. (A) Flow cytometry plots of IL-6 (x axis [top row]), TNF- $\alpha$ , and IL-12 (y and x axes, respectively [bottom row]) expression following stimulation in two representative patient samples (of 16), namely, HCV-P28 and HCV-P29. Histograms are gated on total MDCs (gate I) or monocytes (gate II), as shown in panel B. Arrowheads in dot plots indicate a small population of bright cells that was absent from P29. Numbers in bottom right corners and above bracketed lines indicate the percentages of cells in the designated areas. (B) CD14<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>MHC-II<sup>br</sup> (gate I) and CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup> (gate II) populations used for FACS analysis in the experiments shown in panel A. (C) Frequencies of IL-6<sup>+</sup> MDCs positive for TNF- $\alpha$  and IL-12 for all patients analyzed by FACS after poly(I:C) (triangles) and LPS (circles) activation. Groupwise comparisons between healthy donors ( $n = 7$ ) and CP-N ( $n = 8$ ) and CP-D ( $n = 8$ ) subjects were determined with the Mann-Whitney rank sum test and are shown at the top of the graph.

**Variability in MDC frequency does not account for loss of function of poly(I:C) and LPS innate sensing in the IL-6<sup>+</sup> subset.** As mentioned above, a subpopulation of activated MDCs (IL-6<sup>+</sup>) from viremic patients responded less strongly to the agonists tested, expressing smaller amounts of TNF- $\alpha$  and IL-12 on a per-cell basis. A close look at Fig. 4A (top row) shows that patient HCV-P29 had a reduced frequency of IL-6-positive cells (half that of patient P28), hinting at the involvement of population heterogeneity (i.e., disappearance of circulating MDCs) (Table 1) as a further cause of the differential response outcome. The absence of a small population of CD14<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>MHC-II<sup>br</sup>IL-6<sup>+</sup> cells with the brightest intensities of TNF- $\alpha$  and IL-12 staining might be accounted for by the numerical disappearance of the cytokine-producing cells from the periphery rather than their inability to synthesize normal levels at the single-cell level (intrinsic defect). To address this issue, we enumerated DC subsets in blood, using 10 immunophenotypic surface markers simultaneously with eight-color flow cytometry (Fig. 5). Consistent with other reports (19, 26), we found that HCV-infected patients had 1.7-fold lower frequencies of circulating MDCs than did healthy donors

(mean, 0.24%  $\pm$  0.03% and 0.40%  $\pm$  0.03%, respectively;  $P = 0.001$  by Mann-Whitney U test) (Fig. 5C). Lower frequencies (2.4-fold) of plasmacytoid DCs (PDCs) also characterized the same patients (mean, 0.09%  $\pm$  0.01% and 0.22%  $\pm$  0.02% for patients and healthy controls, respectively;  $P < 0.0001$ ) (Fig. 5C). These results demonstrate that frequencies of circulating DC subsets are decreased during HCV infection. However, an absence of relationship was observed between MDC frequencies and cytokine production at the single-cell level in response to either agonist (Fig. 5D and E). The absence of correlation reflects the fact that some patients with relatively high MDC counts in blood had weak poly(I:C) and LPS responses, as in the case of HCV-P06 (0.33%), whereas some patients with normal functions had some of the lowest MDC frequencies (e.g., patient P33, with a frequency of 0.17%) (see Table 1 and Fig. 2 for functional profiles). Thus, the patients with the lowest frequencies were not necessarily the patients with defects in cytokine expression, and consequently, we can eliminate the variability arising from intersubject differences in MDC subset frequencies as an alternative explanation, or even a contributing factor, to virus-dependent single-cell intrinsic defects. This

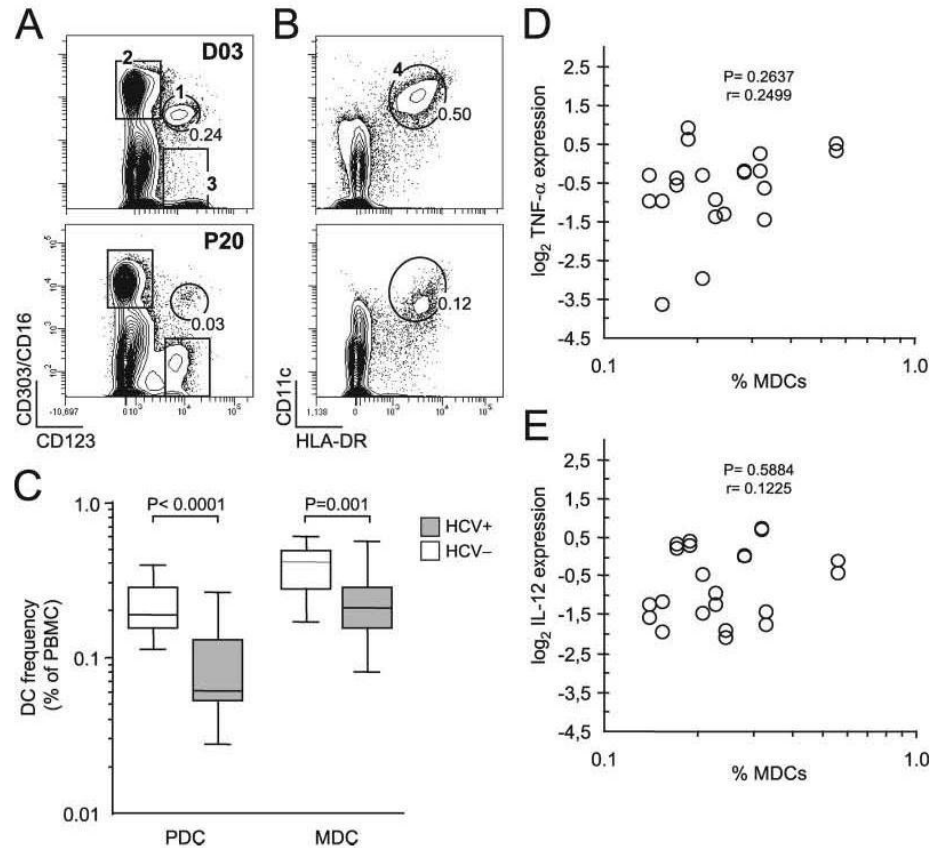


FIG. 5. Influence of HCV on peripheral blood DC subset frequencies. Freshly isolated uncultured PBMCs (day 0) were surface stained for eight-color multiparametric flow cytometry. (A and B) Flow cytometry dot plots representative of circulating frequencies of CD3<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> gated PDCs (A) and MDCs (B) are shown for healthy volunteers (D03 [top]) and HCV-infected patients (P20 [bottom]). Gate 1 corresponds to CD303<sup>+</sup> CD123<sup>br</sup> CD4<sup>br</sup> CD11c<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> PDCs, and gate 4 corresponds to CD11c<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD123<sup>dim</sup> CD62L<sup>+</sup> HLA-DR<sup>br</sup> MDCs. In gate 3, CD123<sup>+</sup> CD303<sup>-</sup> cells, which correspond to basophilic granulocytes, did not stain for HLA-DR, and gate 2 shows CD303<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> NK lymphocytes and monocytes. For each DC gate, the fraction of cells relative to the total number of PBMCs is indicated as a percentage. (C) Box-and-whisker-plot representation of circulating frequencies of CD303<sup>+</sup> PDCs and CD11c<sup>+</sup> MDCs in HCV-infected individuals (gray boxes;  $n = 13$ ) and healthy age-matched controls (white boxes;  $n = 7$ ), measured as percentages of total PBMCs collected after Ficoll separation. The ends of the boxes define the 25th and 75th percentiles, a horizontal line indicates the median, and bars define the 5th and 95th percentiles.  $P$  values were determined with the Mann-Whitney rank sum test and are shown at the top of the graph (HCV<sup>+</sup> versus HCV<sup>-</sup>). (D and E) There is no correlation between TNF- $\alpha$  and IL-12 cytokine production potentials and MDC frequencies in HCV-infected patients. Correlation statistics were analyzed using the Spearman rank correlation test.

finding further supports the concept that virus-induced interference with innate functions *in vivo* affects the capacity of a small population of blood MDCs of viremic patients to adequately respond to activating danger signals.

#### DISCUSSION

There is a lack of consensus behind the concept of virus-induced impairment of DC function during chronic HCV infection. In previous work, monocytes were isolated from HCV-infected individuals and differentiated into DCs during a 1-week culture period with high doses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-4, which likely enhanced antigen-presenting cell capacity and overcame any immunologic defect in DCs present *in vivo*. In contrast, we have mapped danger signal inhi-

tion in the CD14<sup>-</sup> CD33<sup>+</sup> MHC-II<sup>br</sup> MDC blood subset within individual patient samples by clustering patients based on poly(I:C)- and LPS-mediated cytokine up-regulation outcomes. By comparing two similarly viremic groups with distinct functional outcomes, we discovered that responses to stimuli were significantly linked to the abundance of HCV genomic RNA in FACS-purified total DCs for a subgroup of patients (cluster CP-D) and did not correlate with either viremia or deficits in circulating MDC frequencies for HCV-infected patients. The results presented herein confirm the presence of impaired MDCs in some viremic subjects (2, 4, 29) and demonstrate that overall frequencies of nonfunctional cytokine-producing MDCs are considerably small (<3% of overall DCs in blood), indicating the absence of global defects in innate recognition of danger signals by DCs. The activities measured here are more likely to reflect the complex

interactions that occur *in vivo*. For example, most studies have shown that it is possible to engineer phenotypically and functionally intact monocyte precursor-derived DCs from chronically infected individuals (24, 26, 32), and in keeping with this, we found that monocytes from these patients were functionally intact.

Collectively, these data indicate that detection of HCV genomic RNA in DCs and loss of function in the danger signal responsiveness of a small population of MDCs *in vivo* are interrelated rather than independent phenomena. Clearance of cell-associated viral RNA from MDCs of HCV-infected patients after 4 weeks of ribavirin/IFN- $\alpha$  antiviral therapy was reported to restore their CD4<sup>+</sup> T-cell activation potential (43). Due to practical limitations, HCV qRT-PCR analysis could be performed exclusively with purified bulk DCs, not MDCs, in our study. As a consequence, the dynamics of HCV copy numbers in blood DCs and the interplay with functional impairment of pathogen recognition receptor innate sensing responses are highly tempered because of the presence of a large (and variable) fraction of cells not expected to be defective (27) or harboring HCV RNA (20). Furthermore, the fraction of impaired MDCs (defined as IL-6<sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>-</sup> IL-12<sup>-</sup>) accounts for <3% of total DCs in blood; this could explain the apparent low HCV RNA copy number per DC. Thus, even if it is impossible to pinpoint the exact levels of HCV RNA in MDCs in the current study, we estimate that there are between 3 and 20 HCV RNA molecules per cell, assuming segregation of HCV to MDCs nonfunctional for cytokine production (30 of 1,000 overall DCs in blood are defective). Clearly, a continued understanding of HCV-DC dynamics in viremic patients should allow for important insight into how DCs harboring increasing amounts of HCV RNA become functionally exhausted.

Although the molecular basis by which MDCs become unresponsive to danger stimuli in HCV infection is currently unclear, attenuation of the DC cytokine synthesis potential may be considered in the context of previous literature demonstrating that HCV is remarkably proficient at antagonizing poly(I:C)-activated signaling through direct inactivation of events proximal to the TLR3 pathway (reviewed in reference 10). TRIF, a signal bridging adapter for both TLR3 and TLR4, is a known proteolytic substrate of HCV NS3/4A protease (25), and *Trif*<sup>-/-</sup> DCs (16, 22, 44) show defective production of both IL-12 and TNF- $\alpha$ , but not IL-6, in response to poly(I:C) and LPS (TLR4). Considering that a 1,000- to 10,000-fold excess of viral proteins relative to positive-strand RNA is observed with full-length HCV replicon cell clones (34), it is tempting to speculate that even the presence of a few viral genomes per DC may be sufficient to produce concentrations of viral proteins required to effectively interfere with innate defense functions at the single-cell level without the need for productive infection (replication). The HCV RNA density-dependent defect in cytokine production (Fig. 2 and 3) represents an empirical basis consistent with such a hypothesis. However, since we have no evidence in this study for infection and/or NS3/4A expression in DCs, the possibility that chronic infection in some individuals induces an impaired DC response independent of direct virus-DC interaction cannot be excluded. Nonetheless, the ability of NS3/4A to interfere with TRIF-coupled danger signal processing provides a plausible mechanism by which HCV could exert its negative effect on poly(I:C)- and

LPS-activated cytokine production in DCs. Whether such interference indeed occurs has yet to be established.

Recent studies have shown that HCV-like particles pseudotyped with functional E1/E2 envelope proteins bind to DCs through C-type lectins (20, 28, 33). Evidence for selective inhibition of LPS-induced IL-12 and TNF- $\alpha$  production by cross-linking of C-type lectin receptors expressed on MDCs has been provided for CD206 (mannose receptor) (30), CD209 (DC-SIGN) (11), and DCAL-2 (8). Hence, in the absence of direct infection, cross-linking of C-type lectins by HCV glycoproteins as a result of a quantitative virion binding effect at the cell surface could lead to inactivation of TLR3 and TLR4 innate sensing functions of MDCs in chronic infection. Genetic distinctions in HCV variants between viremic patients are also likely to impart differential levels of control and activation of these TLR-dependent pathways in DCs to evade the host's innate response to infection (10). In this context, one of the reasons that defects in DC function extending into the chronic phase of infection are not always clinically evident may be due to the lack of an effective immune response exerting selective pressure for change in the genetic makeup of HCV quasispecies. This would explain the observation that danger responsiveness is not perturbed in MDCs of CP-N patients with persistent infection. Identification at the molecular level of the mechanisms that lead to HCV-induced DC dysfunction will help to resolve the relative contributions of these evasion strategies in reducing innate activation potential as well as to determine whether the variations among different subjects are related to viral pathogenicity.

In any event, virus-induced defects in MDC innate sensing may represent an evolutionary adaptation that favors (with other factors) persistent infection in an otherwise immunocompetent host and prolonged host-parasite coexistence. Most circulating MDCs are unlikely to present HCV antigens; any MDCs that present HCV antigens will most likely have been in contact with pathogen components and therefore will have been particularly susceptible to an attack on innate immune sensing mechanisms essential for their effective antigen presentation to T cells (31, 39). This cell-specific and numerically restrained MDC defect offers a promising field of investigation with which to study and understand the HCV-restricted nature of the deficit in cellular immunity (38). Our observations lend empirical support to a currently working model in which virus-induced impairment of DC-mediated innate immunity would participate in the failure of HCV-specific CD4<sup>+</sup> T-cell help (6); in this model, maintenance of help would be contingent on proper processing and delivery of danger signals by DCs presenting HCV antigens.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Canadian Institute of Health Research grant MOP-79546 (D.L.), a Université de Montréal Novartis/Canadian Liver Foundation Hepatology Research chairmanship (D.L.), an INSERM U743 doctoral scholarship (I.G.R.-G.), and a Canadian Liver Foundation doctoral scholarship (L.).

We thank C. Rice for the p90/HCV FL-long plasmid, C. Richardson for the pHCVrepAB12 plasmid, R. Bartenschlager for providing replicons, L. Montcalm for blood sample collection, D. Murphy for viremia quantification, and A. Lamarre and N. Shoukry for critical reviews of the manuscript. We are indebted to the patients for participating in the study and to P. Melançon, H. Rigsby, M. Laines, S. Reis, and J. Reis for technical assistance.

## REFERENCES

- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
- Anthony, D. D., N. L. Yonkers, A. B. Post, R. Asaad, F. P. Heinzel, M. M. Lederman, P. V. Lehmann, and H. Valdez. 2004. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J. Immunol.* 172:4907-4916.
- Auffermann-Gretzinger, S., E. B. Keefe, and S. Levy. 2001. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 97:3171-3176.
- Averill, L., W. M. Lee, and N. J. Karandikar. 2007. Differential dysfunction in dendritic cell subsets during chronic HCV infection. *Clin. Immunol.* 123:40-49.
- Boisvert, J., X. S. He, R. Cheung, E. B. Keefe, T. Wright, and H. B. Greenberg. 2001. Quantitative analysis of hepatitis C virus in peripheral blood and liver: replication detected only in liver. *J. Infect. Dis.* 184:827-835.
- Bowen, D. G., and C. M. Walker. 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 436:946-952.
- Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks, and D. C. Douek. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* 12:1365-1371.
- Chen, C. H., H. Floyd, N. E. Olson, D. Magaletti, C. Li, K. Draves, and E. A. Clark. 2006. Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood* 107:1459-1467.
- Foy, E., K. Li, C. Wang, R. Sumpter, M. Ikeda, S. M. Lemon, and M. Gale. 2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300:1145-1148.
- Gale, M., and E. M. Foy. 2005. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 436:939-945.
- Geijtenbeek, T. B., S. J. Van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. Vandenberghe-Grauls, B. Appelmek, and Y. Van Kooyk. 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J. Exp. Med.* 197:7-17.
- Goutagny, N., A. Fatmi, V. De Ledinghen, F. Penin, P. Couzigou, G. Inchauspe, and C. Bain. 2003. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.* 187:1951-1958.
- Grakoui, A., N. H. Shoukry, D. J. Woollard, J. H. Han, H. L. Hanson, J. Grayeb, K. K. Murthy, C. M. Rice, and C. M. Walker. 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302:659-662.
- Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526-1529.
- Ho, C. S., D. Munster, C. M. Pyke, D. N. Hart, and J. A. Lopez. 2002. Spontaneous generation and survival of blood dendritic cells in mononuclear cell culture without exogenous cytokines. *Blood* 99:2897-2904.
- Hoeb, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, and B. Beutler. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743-748.
- Irish, J. M., R. Hovland, P. O. Krutzik, O. D. Perez, O. Bruserud, B. T. Gjertsen, and G. P. Nolan. 2004. Single cell profiling of potentiated phosphoprotein networks in cancer cells. *Cell* 118:217-228.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5:987-995.
- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E. G. Pamer, D. R. Littman, and R. A. Lang. 2002. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17:211-220.
- Kaimori, A., T. Kanto, C. Kwang Limn, Y. Komoda, C. Oki, M. Inoue, H. Miyatake, I. Itose, M. Sakakibara, T. Yakushiji, T. Takehara, Y. Matsuura, and N. Hayashi. 2004. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* 324:74-83.
- Kanto, T., M. Inoue, H. Miyatake, A. Sato, M. Sakakibara, T. Yakushiji, C. Oki, I. Itose, N. Hiramatsu, T. Takehara, A. Kasahara, and N. Hayashi. 2004. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.* 190:1919-1926.
- Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsumimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, and S. Akira. 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441:101-105.
- Kawai, T., and S. Akira. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13:816-825.
- Larsson, M., E. Babcock, A. Grakoui, N. Shoukry, G. Lauer, C. Rice, C. Walker, and N. Bhardwaj. 2004. Lack of phenotypic and functional impairment in dendritic cells from chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *J. Virol.* 78:6151-6161.
- Li, K., E. Foy, J. C. Ferreone, M. Nakamura, A. C. Ferreone, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale, and S. M. Lemon. 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:2992-2997.
- Longman, R. S., A. H. Talal, I. M. Jacobson, M. L. Albert, and C. M. Rice. 2004. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* 103:1026-1029.
- Longman, R. S., A. H. Talal, I. M. Jacobson, C. M. Rice, and M. L. Albert. 2005. Normal functional capacity in circulating myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C. *J. Infect. Dis.* 192:497-503.
- Ludwig, I. S., A. N. Lekkerkerker, E. Depla, F. Bosman, R. J. Musters, S. Depraetere, Y. van Kooyk, and T. B. Geijtenbeek. 2004. Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. *J. Virol.* 78:8322-8332.
- Murakami, H., S. M. Akbar, H. Matsui, N. Horiike, and M. Onji. 2004. Decreased interferon-alpha production and impaired T helper 1 polarization by dendritic cells from patients with chronic hepatitis C. *Clin. Exp. Immunol.* 137:559-565.
- Nigou, J., C. Zelle-Rieser, M. Gilleron, M. Thurnher, and G. Puzo. 2001. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J. Immunol.* 166:7477-7485.
- Pasare, C., and R. Medzhitov. 2004. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity* 21:733-741.
- Piedoli, D., S. Tavarini, S. Nuti, P. Colombatto, M. Brunetto, F. Bonino, P. Ciccorossi, F. Zorat, G. Pozzato, C. Comar, S. Abrignani, and A. Wack. 2005. Comparable functions of plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells in chronic hepatitis C patients and healthy donors. *J. Hepatol.* 42:61-67.
- Pohlmann, S., J. Zhang, F. Baribaud, Z. Chen, G. J. Leslie, G. Lin, A. Granelli-Piperno, R. W. Doms, C. M. Rice, and J. A. McKeating. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* 77:4070-4080.
- Quinkert, D., R. Bartenschlager, and V. Lohmann. 2005. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J. Virol.* 79:13594-13605.
- Rollier, C., E. Depla, J. A. Drexhage, E. J. Verschoor, B. E. Verstrepen, A. Fatmi, C. Brinster, A. Fournillier, J. A. Whelan, M. Whelan, D. Jacobs, G. Maertens, G. Inchauspe, and J. L. Heeney. 2003. Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. *Hepatology* 38:851-858.
- Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2:947-950.
- Schulz, O., S. S. Diebold, M. Chen, T. I. Naslund, M. A. Nolte, L. Alexopoulou, Y. T. Azuma, R. A. Flavell, P. Liljestrom, and C. Reis e Sousa. 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433:887-892.
- Shoukry, N. H., A. G. Cawthon, and C. M. Walker. 2004. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:391-424.
- Spörrli, R., and C. Reis e Sousa. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4(+) T cell populations lacking helper function. *Nat. Immunol.* 6:163-170.
- Sumpter, R., Y. M. Loo, E. Foy, K. Li, M. Yoneyama, T. Fujita, S. M. Lemon, and M. Gale. 2005. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J. Virol.* 79:2689-2699.
- Tester, I., S. Smyk-Pearson, P. Wang, A. Wertheimer, E. Yao, D. M. Lewinsohn, J. E. Tavis, and H. R. Rosen. 2005. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J. Exp. Med.* 201:1725-1731.
- Tsubouchi, E., S. M. Akbar, N. Horiike, and M. Onji. 2004. Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. *J. Gastroenterol.* 39:754-762.
- Tsubouchi, E., S. M. Akbar, H. Murakami, N. Horiike, and M. Onji. 2004. Isolation and functional analysis of circulating dendritic cells from hepatitis C virus (HCV) RNA-positive and HCV RNA-negative patients with chronic hepatitis C: role of antiviral therapy. *Clin. Exp. Immunol.* 137:417-423.
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
- Yang, Y., C. T. Huang, X. Huang, and D. M. Pardoll. 2004. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat. Immunol.* 5:508-515.

**ANNEXE 3: Article 2 en co-auteur**

**Primary cultures of human hepatocytes isolated from hepatitis C virus-infected cirrhotic livers as a model to study Hepatitis C infection**



## 1. Mise en contexte et portée

Tout au long de cette thèse, nous avons largement abordé le fait qu'un des principaux freins dans le domaine de la recherche sur le VHC est associé à l'absence de modèle *in vitro* et *in vivo* permettant de reproduire l'infection telle que développée chez l'humain, entre autre parce que l'accès à des cultures d'hépatocytes primaires humains reste très limité. L'obtention d'échantillons humains hépatiques repose en effet sur une étroite collaboration entre chercheurs, chirurgiens et infirmiers ainsi que sur un protocole de recherche minutieusement établi. Une fois la biopsie obtenue, le second obstacle majeur repose sur la difficulté d'isolation des hépatocytes. Comme nous l'avons vu en introduction, les hépatocytes constituent 80% de la biopsie, cependant leur purification et leur mise en culture est un processus complexe et minutieux. Ce fut donc l'objet d'une collaboration avec le Dr Marc Bilodeau, hépatologue et chercheur et de son équipe de recherche du laboratoire d'hépatologie cellulaire du CRCHUM (Hôpital Saint-Luc) qui élaborèrent une technique d'isolation et de purification des hépatocytes normaux provenant de biopsies de patients ayant subi une hépatectomie partielle à la suite d'un hépatocarcinome. Ce matériel nous a permis de mettre en place notre projet de caractérisation des voies antivirales dans des préparations d'hépatocytes primaires humains normaux.

En parallèle, le Dr Bilodeau et son équipe ont développé une technique d'isolation et de mise en culture d'hépatocytes primaires humains infectés avec le VHC, et ce à partir de biopsies de foies de patients chroniquement infectés avec le VHC et ayant subi une transplantation hépatique. Il est donc possible d'isoler, de purifier et de maintenir en culture sur cinq jours ces hépatocytes en conservant des niveaux relativement stables d'ARN viral et d'ARNm codant pour l'albumine et la CYP2E1, marqueurs-clé de différenciation des hépatocytes. Mentionnons toutefois que ce type cellulaire quiescent en culture ne peut être maintenu à long terme ce qui explique pourquoi après quelques jours en culture, les niveaux d'ARN viral diminuent significativement. En effet, il a été démontré que la traduction du VHC est plus faible dans les cellules quiescentes que dans les cellules en multiplication (Honda et al., 2000; Pietschmann et al., 2001). En effet, les hépatocytes primaires sont des cellules dont la capacité de prolifération est limitée, et ce de façon proportionnelle au niveau de différenciation en plus du fait que le DMSO et le collagène employés pour la mise en culture et l'adhésion inhibent également la prolifération (Blanc et al., 1992; De Smet et al., 2001; Kost et Michalopoulos, 1991). Cela dit, la détection de brins négatifs, le relâchement de particules virales dans le surnageant ainsi que la diminution du nombre de copies d'ARN viral en présence d'un inhibiteur spécifique comme BILN2061 sont autant d'observations qui confirment la présence d'une réplication virale en cours dans ce modèle.

## **2. Contributions de la candidate**

Dans ce travail, nous étions responsables de la détermination du nombre de copies d'ARN viral génomique dans les cellules en culture ainsi que dans les surnageants. Cette quantification fut déterminée selon notre protocole de FRET dont nous avons discuté dans le contexte de l'article 1 en co-auteur.

## **3. Article**

## BASIC STUDIES

**Primary cultures of human hepatocytes isolated from hepatitis C virus-infected cirrhotic livers as a model to study hepatitis C infection**Valérie-Ann Raymond<sup>1</sup>, Subajini Selliah<sup>1</sup>, Chantal Éthier<sup>1</sup>, Robert Houle<sup>1</sup>, Loubna Jouan<sup>2</sup>, Thibaut Maniere<sup>1</sup>, Daniel Lamarre<sup>2</sup>, Bernard Willems<sup>3</sup> and Marc Bilodeau<sup>1,3</sup><sup>1</sup> Laboratoire d'hépatologie cellulaire, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôpital Saint-Luc, Montréal, QC, Canada<sup>2</sup> Laboratoire d'immunologie virale, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôpital Saint-Luc, Montréal, QC, Canada<sup>3</sup> Service d'hépatologie, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôpital Saint-Luc, Montréal, QC, Canada**Keywords**

cyclosporine – HCV-infected human primary hepatocyte cultures – HCV-protease inhibitor – interferon

**Correspondence**

Marc Bilodeau, MD, Laboratoires d'hépatologie cellulaire, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôpital Saint-Luc, 264, René-Lévesque est, Montréal, QC, Canada H2X 1P1

Tel: +514 890 8310, ext. 35749

Fax: +514 412 7377

Received 29 August 2008

Accepted 7 January 2009

DOI:10.1111/j.1478-3231.2009.01996.x

**Abstract**

**Background/Aim:** Since the discovery of hepatitis C virus (HCV), researchers have encountered difficulties with *in vitro* models. The aim of this study was to determine whether HCV-infected human primary hepatocytes, isolated from cirrhotic livers at liver transplantation, can be used as a model to study HCV infection. **Methods:** Hepatocytes were isolated with collagenase and cultured over a 20-day period on different matrices. Viral kinetics was monitored with/without treatment by real-time polymerase chain reaction. **Results:** Cell yield and viability were higher with uninfected/non-cirrhotic livers ( $77.2 \pm 1.8\%$ ) in comparison with HCV-infected cirrhotic livers ( $68.8 \pm 12\%$ ). HCV-infected hepatocytes behaved similar to non-infected cells and expressed albumin and cytochrome P4502E1. HCV-positive strand was identified in supernatants and cell lysates. HCV-negative strand was only found inside cells and correlated with viral RNA recovery in the medium. Improvement in the degree of hepatocyte differentiation was associated with better HCV recovery. Antiviral treatment with interferon- $\alpha$ , EX4 and cyclosporine A induced significant reductions in HCV RNA. **Conclusion:** Primary cultures of HCV-infected human hepatocytes from end-stage cirrhotic livers is feasible, represents an excellent model to study specific virus–host interactions and can be used to assess viral replication.

Viruses that cause hepatitis have the capacity to infect hepatocytes and to replicate inside these cells. In the case of hepatitis C virus (HCV), attempts to infect primary cultures of human hepatocytes or primary hepatocyte cell lines have shown that the level of infection is variable in time and unpredictable, despite high-titre infectious sera (1–4). Fetal human hepatocytes have been used with the idea that the stronger cell replicative capacity will help maintain the infection (5, 6). A review of these models has been published earlier (7). More recently, infection of a highly differentiated human hepatocyte cell line deficient in interferon (IFN)-regulatory factor-7 signalling has generated similar results (1, 8).

In recent years, self-replicating JFH-1 molecular constructs producing infectious viral particles have been developed (9–11). This model has strong advantages for the study of the HCV replication cycle but remains limited by its clonal nature and the characteristics of the host cell line. Establishment of an immunodeficient mouse, characterized by humanization of the liver and subsequent infection by HCV (12, 13), is also a significant achievement, but has proven cumbersome to work with (14–16).

An alternative approach to study HCV infection is to use hepatocytes obtained from infected individuals. Lanford *et al.* (17) have reported that hepatocytes isolated from infected chimpanzees can secrete HCV in the medium. Similar results have been obtained by Ito *et al.* (18) with infected human liver biopsies.

Here, we report primary cultures of HCV-infected human hepatocytes from cirrhotic livers removed at transplantation. Morphological and functional observations of these cells, kinetics of HCV RNA in the medium and response to antiviral agents indicate that this system is a reliable model to study HCV infection.

**Materials and methods****Hepatocytes isolation from hepatitis C virus-infected livers**

Informed consent was obtained from patients before surgery. Cirrhotic livers removed at transplantation were examined by a pathologist. Wedge samples (20–50 g) were maintained overnight in a preservation solution (Belzer UW; Dupont Pharma, Mississauga, ON, Canada)

at 4 °C. Hepatocytes were isolated according to Guguen-Guillouzo *et al.* (19) with some modifications: calcium-free HEPES buffer perfusion for 15 min at 20 ml/min following perfusion with 0.55 mg/ml collagenase D (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) and 1.65 mg/ml CaCl<sub>2</sub> for 30 min at 15 ml/min. Viability was assessed by trypan blue exclusion. When indicated, hepatocytes were also isolated from control livers obtained from individuals undergoing liver resection for tumours not associated with a parenchymal liver disorder.

#### Hepatitis C virus-infected human hepatocyte culture

Cells were seeded in William's E (WE) with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) at a density of 50 000 cells/cm<sup>2</sup> onto culture dishes unprecoated with rat tail collagen type I (BD Biosciences, Bedford MA, USA). After 4 h, the medium was replaced by fresh medium containing 10% human serum from HCV-negative donors (with their informed consent), 4.5 × 10<sup>-5</sup> M hydrocortisone and 1% dimethyl sulphoxide (DMSO). In double-layer collagen experiments, the cell monolayer was overlaid with a neutralized collagen gel [8:1:1 (3 mg/ml) collagen/(10 ×) WE/(0.1 N) NaOH]. After 30 min, 2 ml medium was added and was subsequently changed every second day. HCV RNA levels were monitored with/without IFN-α 500 U/ml (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), EX4 5 μM [Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd, Laval, QC, Canada] and cyclosporine A (CsA) 2.5 μg/ml (Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, ON, Canada). These concentrations had all been tested in advance and found not to be toxic to primary cultures of human hepatocytes, as revealed by morphology and lactate dehydrogenase release (data not shown).

#### Reverse transcriptase polymerase chain reaction

RNA from cells and supernatants was extracted with Trizol<sup>®</sup> (Gibco BRL). PCR primers were designed with the PRIMER program (Genetic Computer Group, Madison, WI, USA) and synthesized by the Sheldon Biotechnology Centre of McGill University (Montreal, QC, Canada). The respective forward and reverse primers were: albumin: 5'-AAGATGACAACCCAAACC-3' and 5'-ATCAGCACATTCAAGCAG-3'; CYP2E1: 5'-CAGGAAAACGAGTGTGTG-3' and 5'-AGAAATCCTGACCTCAAAC-3'; HCV (+) strands: 5'-CCCTGTGAGGAAGTACTGTCTT CACGCA-3' and 5'-ACTCGCAAGCACCTATCAGG-CAGTAC-3'; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): 5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3' and 5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG-T3'; HCV (-) strands: 5'-GATGTACCCCATGAGGTCGG-3' and 5'-GCGCGACAAG-GAAGACTTCG-3'.

An equal amount of RNA (250 ng) was mixed with 10 mM Tris, pH 8.3 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 100 μg/ml bovine serum albumin, 100 μM dNTPs, 1 μM primers, 200 U/ml RNase inhibitor (PE Biosystems, Mississauga, ON, Canada), 125 U/ml AMV-reverse transcriptase (RT),

20 U/ml Taq polymerase (Roche Diagnostics) and 20 μCi/ml [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA). Reaction was performed at 50 °C for 15 min followed by polymerase chain reaction (PCR) at 95 °C for 30 s, 59 °C [albumin, GAPDH and HCV (+) strands] or 62 °C (CYP2E1) for 1 min and 72 °C for 90 s using a PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA).

For HCV (-) strands, RNA was reverse transcribed at 70 °C for 15 min using the following procedure: 250 ng RNA was mixed with 12.5 μM 'reverse' primer, 500 U/ml RNase inhibitor, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs, 6 μCi/ml [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP and 250 U/ml thermoresistant reverse transcriptase (rTth) DNA polymerase (PE Biosystems). cDNA was amplified in a mix containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2.5 μM 'forward' primer at 95 °C for 30 s, 66 °C for 45 s and 70 °C for 90 s.

Hepatitis C virus (+) strands were quantified by the COBAS Amplicor HCV Monitor™ Test 2.0 (Roche Diagnostics Systems Inc., Indianapolis, IN, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA from 1 ml culture medium was extracted and RT-PCR was performed with an internal RNA standard from the 5' non-coding region of the HCV. Amplified cDNA was detected by a colorimetric reaction.

#### Western blotting

Cell lysates were prepared from cultures in phosphate-buffered saline pH 7.4, containing 1% Igepal CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml soybean trypsin inhibitor and 100 μM benzamide. Twenty-five micrograms of protein quantified by Bradford (20) were separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Blots were incubated with human albumin antibody followed by alkaline phosphatase (AKP)-conjugated anti-rabbit antibody or with human CYP2E1 antibody (Gentest Corporation, Woburn, MA, USA) followed by horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-goat antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Mouse monoclonal anti-actin antibody kit was used to assess for equal protein loading (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Bound antibodies were detected with 4-nitroblue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate for AKP-conjugated antibodies (Boehringer-Mannheim, Laval, QC, Canada) or with diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich) for HRP-conjugated antibodies.

#### Real-time polymerase chain reaction quantification of hepatitis C virus RNA in supernatants

Reverse transcriptase polymerase chain reaction was performed in 25 μl, with 125 ng/μl of RNA, RT Omniscript kit and Taq PCR Master Mix (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), as described by Rodrigue-Gervais *et al.* (21). A sample of HCV RNA at 10<sup>5</sup> copies, RT-PCR

Mastermix without RNA and plasmid pCR.250T/hG at  $10^7$  copies were amplified in parallel. One-tenth of the amplified product was used for real-time PCR with a LightCycler™ hybridization probe (Roche Diagnostics Systems Inc., Somerville, NJ, USA). A standard curve with the plasmid pCR.250T/hG ( $10^7$ – $10^3$  copies) containing a region of HCV was charted to quantify the amount of HCV copies.

#### Statistical analysis

All data represent values of at least three independent experiments, each from different livers. The data are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean. Differences between groups were analysed by ANOVA for repeated measures (with Dunnett's test for comparison between the means) or Student's paired *t*-test.  $P < 0.05$  were considered significant.

### Results

#### Human hepatocyte isolation from hepatitis C virus-infected cirrhotic livers

Hepatitis C virus-infected and non-infected normal liver isolations between May 1997 and December 2006 are reported in Table 1. Based on data available from 32 samples, genotypes 1, 2, 3, 4 and 5 were found in 59.4, 15.6, 2.5, 9.4 and 3.1% respectively. A significantly lower amount of hepatocytes was obtained from HCV-infected cirrhotic livers ( $100 \pm 14.6 \times 10^6$  cells/isolation) in comparison with normal livers ( $225 \pm 27.1 \times 10^6$ ). Hepatocyte

viability of diseased and normal livers was not significantly different ( $68.8 \pm 12$  vs.  $77.2 \pm 1.8\%$  respectively).

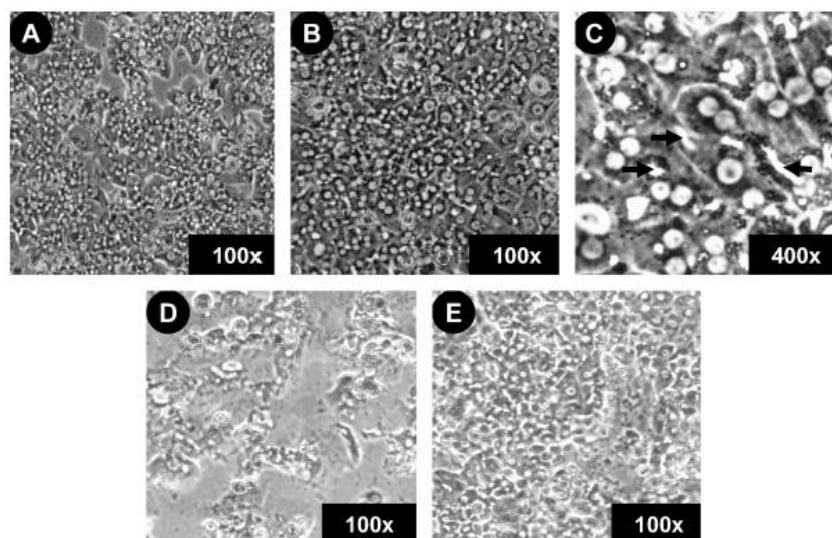
#### Morphological evaluation of hepatocyte cultures

Hepatocytes from HCV-infected livers were morphologically similar to those from normal livers. HCV-infected hepatocytes plated on collagen and cultured with 1% DMSO formed a network of biliary canaliculi, indistinguishable from normal hepatocytes (Fig. 1A, 1B and 1C). Microscopic evaluation of cell cultures on different matrices showed, as expected, striking differences in cell morphology. Cells cultured on plastic dishes presented numerous detached dead cells (Fig. 1D) whereas cells on double-layer collagen remained confluent and maintained intercellular connections (Fig. 1E).

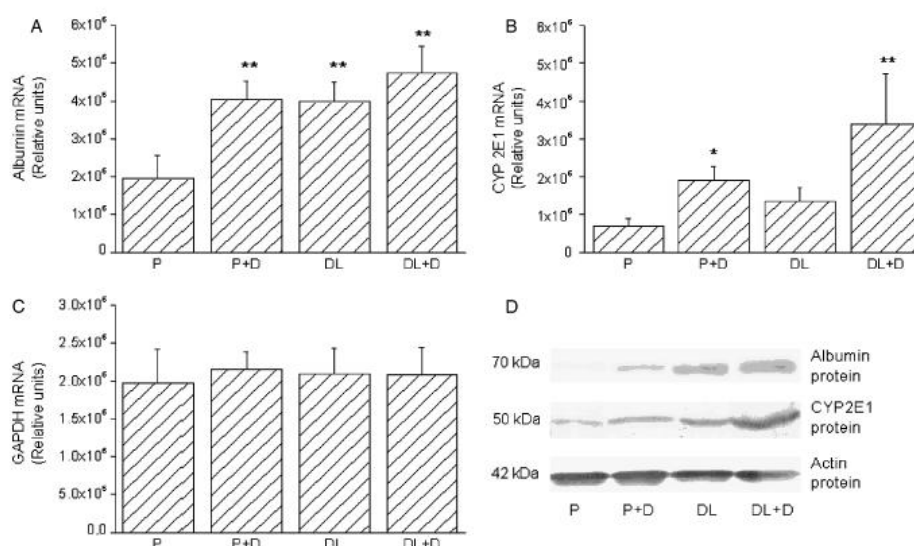
**Table 1.** Comparison of hepatocyte isolation efficiency from hepatitis C virus-infected cirrhotic livers and normal livers

	HCV cirrhotic livers	Normal livers	<i>P</i> -value
Number	69	57	
Amount of isolations/liver	$2.0 \pm 0.1$	1.0	
Yield ( $\times 10^6$ cells)	$100 \pm 14.6$	$225 \pm 27.1$	0.0001
Viability	$68.8 \pm 12$	$77.2 \pm 1.8$	NS (0.52)
Yield/isolation	$50 \pm 7.7$	$225 \pm 27.1$	0.0001
Age	$56.2 \pm 0.98$	$60.21 \pm 1.31$	ND
Gender	79.5% male	57.1% male	ND

HCV, hepatitis C virus; ND, not defined; NS, not significant.



**Fig. 1.** Morphology of hepatitis C virus (HCV)-infected hepatocytes. (A) Phase contrast microscopy of a primary culture of non-HCV-infected human hepatocytes plated on collagen and cultured for 7 days with dimethyl sulphoxide (DMSO) ( $\times 100$ ). (B) Primary culture of human hepatocytes isolated from HCV-infected liver removed at transplantation and cultured for 7 days with DMSO ( $\times 100$ ). (C) Higher magnification of the same culture as in B ( $\times 400$ ). Arrows point towards biliary canaliculi. (D) Primary culture of HCV-infected hepatocytes plated on plastic for 7 days without DMSO ( $\times 100$ ). (E) Primary culture of HCV-infected hepatocytes plated on a double-collagen layer for 7 days without DMSO ( $\times 100$ ).



**Fig. 2.** Effect of dimethyl sulphoxide (DMSO) and double-collagen layer on gene expression. Semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of mRNA levels of (A) albumin, (B) CYP2E1 and (C) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in hepatocytes plated on plastic (P) in a double-collagen layer (DL) with or without DMSO (D) and cultured for 20 days. Each histogram is the mean  $\pm$  SEM of six independent experiments. Data were analysed by ANOVA and post-test analysis by Dunnett's test using plastic as the reference. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  compared with plastic. (D) Representative Western blots of albumin, CYP2E1 and actin protein levels.

#### Effect of matrix and culture conditions on hepatocyte differentiation and hepatitis C virus replication

The following experiments have all been performed on hepatocytes isolated from genotype 1-infected livers. Four culture conditions were created to evaluate the relationship between the degree of hepatocyte differentiation and the capacity of HCV to replicate. Hepatocytes were cultured (i) on plastic, (ii) on plastic with DMSO, (iii) between double-layer collagen and (iv) between double-layer collagen with DMSO. Addition of DMSO and double-layer collagen has previously been shown to help maintain hepatocyte differentiation and survival (22, 23). Primary hepatocytes were maintained in these conditions and harvested at day 20. Figure 2(A) and (B) illustrates that double-layer collagen with DMSO improved albumin and CYP2E1 mRNAs, confirming the positive effect of these maneuvers on hepatocyte differentiation. Consistent with these results, Western blots showed that human albumin and CYP2E1 protein levels were also maintained under these conditions. No significant variations in GAPDH and actin levels were observed between conditions (Fig. 2C and 2D).

#### Identification of hepatitis C virus-positive and -negative strands

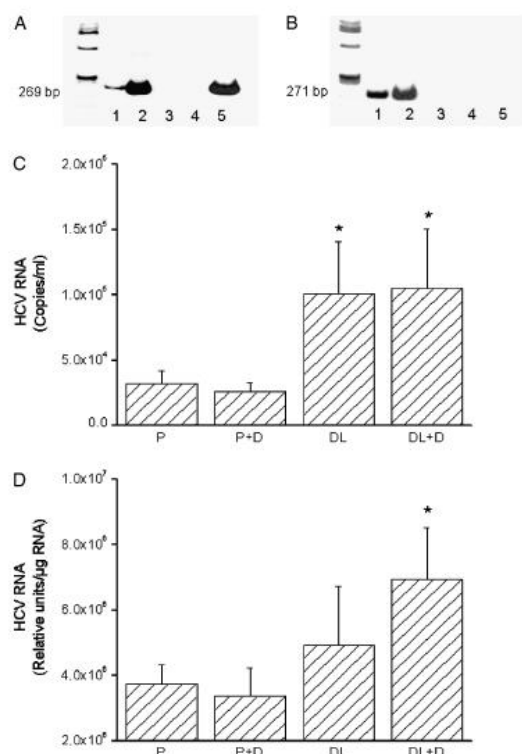
We evaluated the presence of HCV-positive (coding) strands in cell lysates at 7 days post-seeding. The expected 269 bp band was identified in HCV-positive hepatocytes cultured for 7 days, HCV-infected liver

biopsies and HCV RNA-positive serum (Fig. 3A, lanes 1, 2 and 5 respectively). Amplification of HCV-negative (replicative intermediate) strands, performed with rTth to ensure strand specificity, was detected in cell lysates and HCV-infected liver biopsies (Fig. 3B, lanes 1 and 2 respectively). On the other hand, we could not identify the negative strands in serum from high-titre, HCV RNA-positive individuals (Fig. 3B, lane 5).

Dimethyl sulphoxide did not significantly modify the shedding of HCV (+) strands in the medium, whereas hepatocytes in double-layer collagen supports showed improved viral shedding compared with plastic dishes (Fig. 3C). Because dead cells were more prevalent in plastic cultures, we concluded that the identification of HCV RNA was not only a carryover from the original cells. Cultures in the fourth condition did not increase the level of the HCV (+) strand, indicating the minor importance of DMSO on HCV yield recovery. The effect of these culture conditions was similar on HCV ( ) strands inside cells, except that the magnitude of the increase was less in double-layer collagen cultures (Fig. 3D).

#### Kinetics of hepatitis C virus and hepatocyte-specific gene expression in 2-week cultures

In order to assess the further links between hepatocyte behaviour and HCV replication, we performed a kinetic study over a 2-week period. HCV (+) strand was measured in the medium by a Roche Amplicor™ assay. The medium was renewed every second day; thus, data

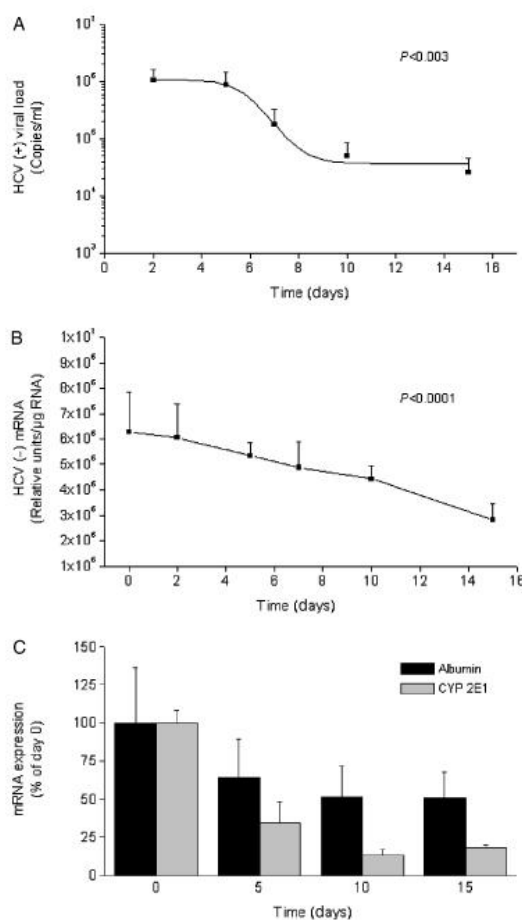


**Fig. 3.** Effect of dimethyl sulphoxide (DMSO) and double collagen on viral replication. mRNA expression analysed by reverse transcriptase polymerase chain reaction of (A) hepatitis C virus (HCV) (+) strand and (B) HCV (-) strand in hepatocytes cultured for 7 days (1), HCV-infected liver biopsy (2), mRNA amplification without reverse transcription in hepatocytes cultured for 7 days (3) and in liver biopsy (4) and HCV RNA (+)-infected serum (5). (C) Quantification of HCV (+) strand in the medium and (D) semiquantitative HCV (-) strand in the cell lysate of 20-day hepatocyte culture on plastic (P) or in a double-collagen layer (DL) with or without DMSO (D). Each point is the mean  $\pm$  SEM of six independent experiments. Data were analysed by ANOVA and post-test analysis by Dunnett's test using plastic as the reference \* $P < 0.05$  compared with plastic.

represent the amount of new viral shed in the medium. The initial viral load varied from  $10^6$  to  $10^4$  copies/ml. Viral HCV RNA was detectable in the medium until day 15. The results show a significant decrease in the concentration of HCV (+) strands. The amount tended to be stable for the first 5 days, after which a steady decrease was observed (Fig. 4A).

Hepatitis C virus (-) strands could only be identified within cells. The results, expressed per total cellular RNA, showed a slower but steady decline in the amount of (-) strand until day 15 post-seeding (Fig. 4B).

In addition, albumin and CYP2E1 mRNA expression were evaluated at days 0, 5, 10 and 15 by semiquantitative RT-PCR. The expression of mRNA decreased until day 15



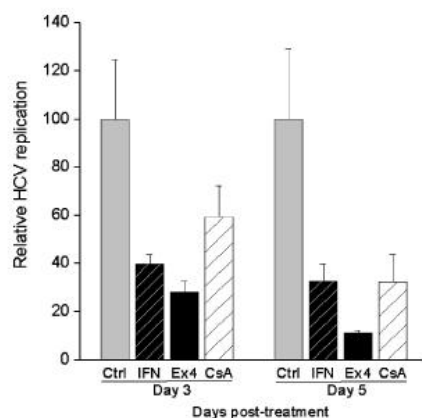
**Fig. 4.** Kinetics of hepatitis C virus (HCV) (+) and HCV (-) strand detection and kinetics of differentiation gene expression. Quantification of HCV (+) strand (A) in the medium, semiquantitative determination of HCV (-) strand in the cell lysate (expressed per microgram of total cellular RNA) (B) and mRNA levels of albumin and CYP2E1 (C) in hepatocytes cultured on collagen for 15 days with dimethyl sulphoxide. Each point is the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Data were analysed by ANOVA on repeated measures.

(Fig. 4C), the decrease in CYP2E1 being more pronounced than the one observed in albumin.

Altogether, these results show that significant changes take place in the behaviour of cultured hepatocytes over the time of culture. The change in the CYP2E1 and albumin levels confirms the progressive loss in hepatocyte-specific functions that take place in culture.

#### Evaluation of hepatitis C virus replication in cell culture

Hepatitis C virus replication was evaluated by treating HCV-infected hepatocyte cultures with 500 U/ml of



**Fig. 5.** Evaluation of hepatitis C virus (HCV) replication in hepatocyte culture with/without treatments by real-time polymerase chain reaction (PCR). HCV-infected hepatocytes were plated on single-layer collagen in the presence of 1% dimethyl sulphoxide and  $4.5 \times 10^{-5}$  M hydrocortisone. Cells were left alone (Ctrl) or treated with 500 U/ml interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), 5  $\mu$ M EX4 or 2.5  $\mu$ g/ml cyclosporine A (CsA) up to 3 and 5 days. HCV RNA quantification was measured in the supernatant by real-time PCR. Each point is the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Data were analysed by ANOVA and significant differences were observed in the supernatant of culture treated with EX4 ( $P < 0.01$ ) and IFN- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ) after 3 days of treatment compared with the untreated control. Furthermore, the effect of treatment was also apparent after 5 days post-treatment, with a  $P$ -value of  $< 0.01$  for EX4 and IFN- $\alpha$  and  $< 0.05$  for CsA.

IFN- $\alpha$ , 5  $\mu$ M of EX4 [a specific HCV protease inhibitor kindly provided by Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd or 2.5  $\mu$ g/ml of CsA. HCV RNA viral loads were monitored on days 3 and 5 in the cell culture medium.

Significant decreases were detected on days 3 and 5 post-treatment with all three compounds compared with the controls (Fig. 5). EX4 was the most potent agent, reducing HCV RNA by  $71.6 \pm 4.4\%$  at day 3 and  $98.8 \pm 1.0\%$  by day 5 ( $P < 0.01$ ). IFN- $\alpha$  decreased HCV RNA by  $61.2 \pm 4.2\%$  at day 3 and  $67.2 \pm 7.0\%$  at day 5. CsA decreased HCV RNA levels in our model by  $40.6 \pm 13.1\%$  at day 3 and  $77.3 \pm 11.2\%$  at day 5.

## Discussion

Even though many different models have been used to study HCV infection, none of them perfectly reproduces the *in vivo* infection observed in humans. In this article, we describe a model utilizing liver material obtained from HCV-infected patients, therefore, presenting the viral diversity present in humans as well as closely mimicking the environment in which the virus evolves.

Our study illustrates the possibility of isolating hepatocytes from HCV-infected end-stage cirrhotic livers. In fact, the difference between the yield of viable cell recovery in comparison with normal livers is not

significant and we demonstrate that hepatocytes from these diseased livers can be cultured similarly to those from normal livers. It also suggests that hepatocyte isolation and culture from other types of cirrhosis would be feasible. This could be considerably useful for the study of rare disorders that do not have a representative human or cellular model to work with.

Our data show that HCV-infected hepatocytes form biliary canaliculi and perform hepatocyte-specific functions. In addition, over a 20-day course, the expression of liver-specific albumin and CYP2E1 genes can be maintained, although at significantly lower levels than *in vivo*. These findings are consistent with those of others who have used primary cultures of hepatocytes from normal human livers (24–27). Optimizing hepatocyte differentiation and survival through modification of the culture conditions resulted in improved recovery of HCV-positive and -negative strands. This being said, there was no perfect correlation between the levels of albumin and CYP2E1 expression with levels of HCV-positive or -negative RNA strands. Indeed, DMSO was as efficient as double-layer collagen in maintaining albumin and CYP2E1 RNA and protein levels whereas it had no significant effect on the recovery of HCV (+) strands from the medium or the level of HCV (–) strands inside the cells. These results are somewhat surprising because DMSO has been shown to significantly improve the replication efficiency of hepatitis B virus in primary cultures of human hepatocytes (28). This could be due to the effects of DMSO on viral cell entry, cell survival or on cell proliferation, parameters that were not quantified in our study.

On the other hand, hepatocyte culture in a double-layer collagen improved (+) strand recovery in supernatants. The enhancement in the amount of HCV (+) strands could have been due to significant improvement in hepatocyte viability, as suggested by Figure 3C. Therefore, in our hands, the best condition to maintain viral replication is collagen-coated culture. It should be mentioned that human hepatocytes in primary cultures fail to significantly proliferate (29), which is likely to affect the replication efficacy of HCV. Indeed, HCV translation has been shown to be lower in quiescent cells in comparison with exponentially growing cells (30, 31). Acquisition of a high-degree differentiation phenotype is usually associated with a low level of proliferation in hepatocytes. Both DMSO and double-layer collagen have been demonstrated to be inhibitory for hepatocyte proliferation (32, 33). It would, therefore, be appropriate to evaluate the effect of enhanced proliferation with the addition of growth factors to our cultures.

Continuous release of HCV particles in supernatants of these cultures was observed for 15 days. Replicating intermediates (HCV-negative strands) were consistently detected in cell lysates. These results suggest persistent, ongoing replication (34) and confirm the data obtained by Ito *et al.* (18) with infected human liver biopsy specimens (a procedure that significantly limits the yield



of isolated cells). In contrast, *de novo* infection of primary human hepatocyte cultures or of a modified non-transformed human hepatocyte cell line revealed that the release of viral genomes and the level of intracellular negative strands fluctuated with time, adopting an intermittent pattern (3, 4, 8). This discrepancy could be due to the percentage of infected cells, which is presumably more important in our model. Analysis of viral kinetics indicates a time-dependent decline in the levels of HCV strands, the decrease being more significant after 5 days of culture in double-layer collagen cultures but already apparent in the first 5 days when the cells were coated on a single layer of collagen (Fig. 4). Ito *et al.* (18) had also shown a decline in the HCV RNA titre in their culture supernatants. The decrease in HCV RNA titres may again be due to loss of differentiation, which has been shown in primary cultures of hepatocytes (35). We do not believe that the viral load level affects the decrease of viral titre observed in culture because this was observed irrespective of the initial viral load. Adaptation of the virus to culture conditions might, on the other hand, be a mechanism that could impact upon the degree of viral replication, as has been observed in other cell culture systems (36, 37).

Consequently, we chose to evaluate the efficacy of antiviral agents on HCV replication over the first 5 days. The three different compounds used have each been demonstrated to inhibit HCV replication in the replicon model. IFN- $\alpha$  has been administered to treat HCV-infected patients for many years and can block or impair viral replication via the synthesis of numerous enzymes as part of the cellular antiviral response that interferes with viral processes (38). EX4 is a non-covalent inhibitor of NS3-4A protease of HCV and a chemical precursor of the highly effective first-ever direct HCV inhibitor tested in human beings (BILN 2061). It has been demonstrated to achieve a rapid decline in HCV RNA levels, especially in genotype 1-infected individuals (38–41). Finally, the anti-HCV activity of CsA possibly occurs via its capacity to inhibit the activity of cyclophilins (41, 42). The significant decrease of HCV RNA levels recovered in the supernatant of treated cultures in comparison with the controls is a clear indication of the antiviral activity of these compounds and thus evidence of viral replication. The results of these experiments are strong supportive arguments that viral replication does indeed take place in these cells.

Despite the difficulties observed (availability of livers, risks of transmission, incapacity of primary hepatocytes to proliferate), this model more closely mimics what really occurs in real life. Indeed, the full host environment is present to interact with viral proteins. This environment can be significantly different than the one of the currently used cell lines where the innate antiviral machinery has been shown to be deficient in comparison with normal cells, thus impacting on viral replication (43). Many observations made with these models will need to be confirmed in human hepatocytes as has been

the rule in the field of drug development and toxicity. This model also differs from the currently used models (such as the replicon and the JFH-1) in that the viral population is likely to be inhomogenous (non-cloned) and closely similar to what is observed in humans (no adaptative mutations).

In conclusion, we believe that cultured HCV-infected hepatocytes have the definitive advantage of bypassing the need to infect these cells and offer a unique opportunity to evaluate hepatocyte–virus interactions under strict experimental conditions, especially early in culture, when both the degree of hepatocyte differentiation and the level of viral expression are optimal. This model might also be useful to study the HCV replication cycle and, as we have demonstrated, to test antiviral agents.

### Acknowledgements

This work was supported by a Canadian Liver Foundation grant. Authors acknowledge editorial assistance of Ovid Da Silva, Research Support Office, CR-CHUM. L. J. is a Canadian Liver Foundation Graduate Student recipient.

### References

1. Aly HH, Watashi K, Hijikata M, *et al.* Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol* 2007; **46**: 26–36.
2. Castet V, Fournier C, Soulier A, *et al.* Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. *J Virol* 2002; **76**: 8189–99.
3. Fournier C, Sureau C, Coste J, *et al.* In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1998; **79**: 2367–74.
4. Rumin S, Berthillon P, Tanaka E, *et al.* Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol* 1999; **80**: 3007–18.
5. Iacovacci S, Sargiacomo M, Parolini I, *et al.* Replication and multiplication of hepatitis C virus genome in human foetal liver cells. *Res Virol* 1993; **144**: 275–9.
6. Carloni G, Iacovacci S, Sargiacomo M, *et al.* Susceptibility of human liver cell cultures to hepatitis C virus infection. *Arch Virol* 1993; **8**: 31–9.
7. Grakoui A, Hanson HL, Rice CM. Bad time for Bonzo? Experimental models of hepatitis C virus infection, replication, and pathogenesis. *Hepatology* 2001; **33**: 489–95.
8. El Farrash MA, Aly HH, Watashi K, *et al.* In vitro infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin. *Microbiol Immunol* 2007; **51**: 127–33.
9. Kato T, Date T, Miyamoto M, *et al.* Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 2003; **125**: 1808–17.

10. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, *et al.* Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; **309**: 623–6.
11. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; **11**: 791–6.
12. Mercer DE, Schiller DE, Elliott JE, *et al.* Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Mature Med* 2001; **7**: 927–33.
13. Walters KA, Joyce MA, Thompson JC, *et al.* Host-specific response to HCV infection in the chimeric SCID-beige/Alb-uPA mouse model: role of the innate antiviral immune response. *PLoS Pathog* 2006; **2**: e59.
14. Lanford RE, Bigger C. Advances in model systems for hepatitis C virus research. *Virology* 2002; **293**: 1–9.
15. Randall G, Rice CM. Hepatitis C virus cell culture replication systems: their potential use for the development of antiviral therapies. *Curr Opin Infect Dis* 2001; **14**: 743–7.
16. Wu GY, Konishi M, Walton CM, *et al.* A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* 2005; **128**: 1416–23.
17. Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR. Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology* 1994; **202**: 606–14.
18. Ito T, Mukaigawa J, Zuo J, *et al.* Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *J Gen Virol* 1996; **77**: 1043–54.
19. Guguen-Guillouzo C, Campion JP, Brissot P, *et al.* High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol Intern Rep* 1982; **6**: 625–8.
20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248–54.
21. Rodrigue-Gervais IG, Jouan L, Beaulieu G, *et al.* Poly(I:C) and lipopolysaccharide innate sensing functions of circulating human myeloid dendritic cells are affected in vivo in hepatitis C virus-infected patients. *J Virol* 2007; **81**: 5537–46.
22. Isom HC, Secott T, Georgoff I, Woodworth C, Mummaw J. Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 3252–6.
23. Dunn JC, Tompkins RG, Yarmush ML. Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog* 1991; **7**: 237–45.
24. Guillouzo A, Beaune P, Gascoïn MN, *et al.* Maintenance of cytochrome P-450 in cultured adult human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1985; **34**: 2991–5.
25. Maurel P. The use of human hepatocytes in primary culture and other in vitro systems to investigate drug metabolism in man. *Adv Drug Deliv Rev* 1996; **22**: 105–32.
26. Kostubsky VE, Ramachandran V, Venkataraman R, *et al.* The use of human hepatocyte cultures to study the induction of cytochrome P-450. *Drug Metab Dispos* 1999; **27**: 887–94.
27. Gerbal-Chaloin S, Pascucci JM, Pichard-Garcia L, *et al.* Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos* 2001; **29**: 242–51.
28. Gripon P, Diot C, Theze N, *et al.* Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol* 1988; **62**: 4136–43.
29. Blanc P, Etienne H, Daujat M, *et al.* Mitotic responsiveness of cultured adult human hepatocytes to epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and human serum. *Gastroenterology* 1992; **102**(Part 1): 1340–50.
30. Honda M, Kaneko S, Matsushita E, *et al.* Cell cycle regulation of hepatitis C virus internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology* 2000; **118**: 152–62.
31. Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 2001; **75**: 1252–64.
32. De Smet K, Loyer P, Gilot D, *et al.* Effects of epidermal growth factor on CYP inducibility by xenobiotics, DNA replication, and caspase activations in collagen I gel sandwich cultures of rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2001; **61**: 1293–303.
33. Kost DP, Michalopoulos GK. Effect of 2% dimethyl sulfoxide on the mitogenic properties of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor in primary hepatocyte culture. *J Cell Physiol* 1991; **147**: 274–80.
34. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000; **81**: 1631–48.
35. Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* 2001; **75**: 4614–24.
36. Delgrange D, Pillez A, Castelain S, *et al.* Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* 2007; **88**: 2495–503.
37. LeCluyse EL, Bullock PL, Parkinson A. Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. *Adv Drug Deliv Rev* 1996; **22**: 133–86.
38. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2000; **81**(Part 10): 2341–64.
39. Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, *et al.* An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 2003; **426**: 186–9.
40. Llinàs-Brunet M, Bailey M, Déziel R, *et al.* Studies of the C-terminal of hexapeptide inhibitors of the hepatitis C virus serine protease. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; **8**: 2719–24.
41. Neyts J. Selective inhibitors of hepatitis C virus replication. *Antiviral Res* 2006; **71**: 363–71.
42. Nakagawa M, Sakamoto N, Tanabe Y, *et al.* Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* 2005; **129**: 1031–41.
43. Li K, Chen Z, Kato N, Gale M Jr, Lemon SM. Distinct poly(I:C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *J Biol Chem* 2005; **280**: 16739–47.