

## **Rapport d'activité 2007 de l'action coordonnée 29 « Mécanismes d'entrée des virus des hépatites dans leurs cellules cibles »**

### **Rappel des priorités de la recherche dans le domaine de l'entrée virale et présentation de résultats récemment obtenus ainsi que des objectifs pour l'année 2007:**

- 1) Etudes structurales. Afin de progresser dans la compréhension des mécanismes d'entrée virale, il est impératif que nous ayons accès à des données structurales. Une des priorités de notre AC est donc de stimuler la collaboration entre différentes équipes afin que des études structurales des protéines d'enveloppe du VHC puissent être développées. Dans un premier temps, la priorité doit être mise sur la détermination de la structure de l'ectodomaine de la glycoprotéine E2 ainsi que celle des domaines transmembranaires des glycoprotéines E1 et E2. Le soutien financier de l'équipe de Félix Rey a permis de développer un projet de recherche sur l'expression et la purification d'une forme tronquée de E2 dans des conditions optimales pour la cristallisation. Ces travaux n'ont pas encore conduit à une publication, mais il faut rappeler qu'il s'agit d'un projet de longue haleine dont les retombées auront un impact majeur pour la compréhension des mécanismes d'entrée du VHC. Pour ce qui est des domaines transmembranaires des protéines d'enveloppe, l'équipe de F Penin met actuellement ses efforts sur le développement de la RMN du solide.
- 2) Modèles d'étude pour l'entrée du VHC : Il a été souligné l'importance de rapprocher les modèles utilisés actuellement pour étudier l'entrée virale. Un grand nombre de projets sont actuellement basés sur un outil pseudoparticules (VHCpp) utilisant un vecteur rétroviral ayant incorporé les protéines d'enveloppe du VHC à sa surface. Cet outil représente une avancée très importante pour l'étude de l'entrée du VHC et il permet de développer rapidement des études fonctionnelles. De plus, avec le développement récent d'un système de culture cellulaire pour le VHC (VHCcc), nous possédons une gamme importante d'outils viraux pour étudier l'entrée du VHC (Rouillé et al., 2006). Il est cependant important de valider dans la mesure du possible les résultats obtenus avec les VHCpp et VHCcc dans des modèles d'hépatocytes primaires et de cellules HepaRG (proches des hépatocytes primaires) avec du virus natif. Il est donc important que les différentes équipes impliquées dans l'AC29 puissent comparer leurs résultats en utilisant les différents modèles disponibles. C'est ainsi que l'équipe de Patrick Maurel en collaboration avec l'équipe de Jean Dubuisson a montré que la molécule CD81 était également utilisée pour l'entrée en hépatocyte primaire du VHC isolé de patients infectés (Castet et al., manuscrit soumis pour publication). Les études comparatives avec les VHCcc ont cependant montré de légères différences dans l'accès du virus à CD81. En effet, alors que les VHCcc sont neutralisables par une forme soluble de CD81, aucune neutralisation par cette même forme soluble n'a été observée pour le virus isolé de patients. Des différences semblent également exister entre les VHCpp et le virus isolé de patients pour l'utilisation du récepteur SR-BI (Maillard et al., 2006). Il est également important de poursuivre des études sur le virus GBV-B (virus proche du VHC) pour lequel un modèle animal est disponible afin de déterminer pour quels aspects ce modèle peut être intéressant pour le VHC. Ces travaux sont poursuivis par l'équipe d'Annette Martin.
- 3) Recherche sur les récepteurs : Le système pseudoparticules a permis de montrer que les molécules CD81 et SR-BI sont impliquées dans l'entrée du VHC. Ces données ont de plus été confirmées avec le système VHCcc. Ces deux molécules ne sont cependant pas suffisantes pour permettre l'entrée des pseudoparticules lorsqu'elle sont exprimées de façon ectopique. Il a été rapporté au cours de l'année 2006 par l'équipe de CM Rice (Rockefeller University) que la molécule Claudine 1 serait également un facteur cellulaire essentiel pour l'entrée virale. Cependant la

coexpression de CD81, SR-BI et Claudine 1 n'est pas suffisante pour l'entrée virale. Il est donc important d'identifier d'autres molécules conduisant à l'entrée virale. Il serait de plus intéressant d'identifier la séquence des événements conduisant à l'entrée virale et de comprendre le rôle fonctionnel des molécules impliquées dans l'entrée virale. Les différentes équipes impliquées dans la recherche sur les récepteurs orientent donc leur recherche dans ce sens. Il est intéressant de noter que des membres de l'équipe de Lille ont identifié une molécule exprimée à la surface de différentes lignées non hépatocytaires qui inhibe l'entrée virale lorsqu'elle est exprimée en cellules Huh-7, suggérant que l'hépatotropisme pourrait en partie reposer sur l'absence de cette molécule inhibitrice de l'entrée virale (Rocha-Perugini et al., manuscrit soumis pour publication). Il est important de noter que cette molécule inhibe l'entrée du VHC en interagissant avec CD81. Il est également intéressant à noter que des travaux de l'équipe de Lille ont également montré qu'une lectine (la cyanovirin-N) isolée de cyanobactéries est capable d'inhiber l'entrée du VHC à des concentrations nanomolaires en interagissant avec les glycanes des protéines d'enveloppe du virus (Helle et al., 2006). De plus, cette interaction conduit à l'inhibition de l'interaction entre E2 et le récepteur CD81. Ces résultats indiquent que des approches antivirales inhibant l'entrée virale sont possibles pour le VHC.

- 4) Etude des mécanismes de fusion et identification du peptide de fusion : L'étude des mécanismes de fusion fait partie intégrante de l'étude de l'entrée virale. L'analyse structurale des changements conformationnels conduisant à la fusion entre l'enveloppe virale et une membrane cellulaire est à la base de nouvelles approches thérapeutiques notamment dans le domaine du VIH. Ceci implique à la fois des études biologiques et structurales. Un rapprochement entre les équipes de structuralistes et de virologistes moléculaires a permis de développer une approche in vitro pour l'étude de la fusion. Cet outil développé par Eve Pécheur en collaboration avec l'équipe de François-Loïc Cosset devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes de fusion (Lavillette et al., 2006). Cet outil est actuellement utilisé par plusieurs équipes de l'AC29 pour essayer d'identifier les déterminants viraux impliqués dans la fusion (Lavillette et al., soumis pour publication) ainsi que pour étudier le rôle des domaines transmembranaires dans l'entrée virale (Ciczora et al., 2007).
- 5) Identification de la voie d'endocytose empruntée : Les virus enveloppés peuvent entrer dans la cellule cible en fusionnant leur enveloppe avec la membrane plasmique ou avec une membrane d'un compartiment interne. Dans ce deuxième cas, le virus doit d'abord entrer dans la cellule par endocytose. Les données actuellement disponibles sur le VHC suggèrent que ce virus entre dans les cellules cibles par endocytose. Différentes voies d'endocytose sont décrites et il est important d'identifier et de caractériser la voie qui est empruntée par le VHC. Des premiers travaux de membres de notre groupe indiquent que le VHC emprunte une voie dépendante de la clathrine (Blanchard et al., 2006). Il est cependant important de poursuivre les investigations afin d'identifier avec précision le compartiment intracellulaire où a lieu la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule cible. Il serait pour cela intéressant de suivre l'entrée virale dans des cellules vivantes. Cela implique le développement de virus fluorescents.
- 6) Caractérisation des particules natives du VHC : Peu d'informations existent actuellement sur les particules natives du VHC. Elles semblent associées à des lipoprotéines qui pourraient jouer un rôle dans l'entrée virale. Il est essentiel de poursuivre des travaux sur la caractérisation de ces particules natives pour une meilleure compréhension des mécanismes d'entrée du VHC. Le nouveau système de culture cellulaire pour le VHC devrait nous aider à la caractérisation de biochimie de particules fonctionnelles. Il est cependant nécessaire d'étendre nos études à la comparaison avec des particules isolées de patients. De façon intéressante, les

travaux de P André ont montré que les particules virales isolées de patients s'associent préférentiellement avec des lipoprotéines contenant de l'ApoB48 (Diaz et al., 2006). Ces résultats posent la question de la contribution de l'intestin pour la production de virus circulant. Une collaboration étroite entre les équipes utilisant le nouveau système de culture cellulaire et celles travaillant sur le virus natif est essentielle pour déterminer la composition biochimique des particules virales fonctionnelles.

- 7) Neutralisation virale et entrée virale : les anticorps neutralisants interfèrent avec l'entrée virale. Il est donc essentiel d'étudier les mécanismes conduisant à la neutralisation virale ainsi que l'échappement du virus à la réponse neutralisante. Il est en effet important de comprendre la dualité entre le besoin d'échapper (ou d'éviter) la réponse immune humorale neutralisante et de maintenir des capacités constantes à reconnaître des récepteur(s) et co-récepteur(s). Ce travail doit se faire à 2 niveaux (clinique et fondamental). Au niveau clinique, il est en effet nécessaire dans un premier temps d'établir des corrélations éventuelles entre la présence d'anticorps neutralisants chez le patient et la présence d'un niveau potentiel de contrôle de l'infection. Certains travaux ont déjà été développés dans ce sens (Lavillette et al., 2005) mais d'autres études s'avèrent nécessaires. Au niveau fondamental, il a été montré que les glycanes des protéines d'enveloppe du VHC participent au masquage d'épitopes neutralisant (Helle et al., manuscrit en préparation). De plus, les glycanes participant au masquage des épitopes réduisent également l'accès au récepteur CD81. Il a également été montré dans le cadre d'une collaboration entre des membres de notre AC que les lipoprotéines humaines de type HDL qui sont présentes dans les sérums de patients infectés par le VHC réduisent l'efficacité des anticorps neutralisants anti-VHC (Voisset et al., 2006 ; Dreux et al., 2006).
- 8) Un aspect essentiel qui émerge dans l'étude de l'entrée virale concerne l'interrelation entre l'entrée du VHC et le métabolisme lipidique. Il est connu depuis longtemps que les particules du VHC isolées de patients sont associées à des lipoprotéines de type LDL ou VLDL. Plus récemment, il a été montré que le récepteur aux LDL joue un rôle dans l'entrée cellulaire de particules virales isolées de patients (Castet et al., 2007). Des membres de notre AC ont également montré que les lipoprotéines HDL facilitent l'entrée du VHC par un mécanisme dépendant de l'activité transfert lipidique de SR-BI (Voisset et al., 2005, Bartosch et al., 2005). Plus récemment, il a été montré que l'apolipoprotéine sérum amyloïde A (SAA) inhibe l'entrée du VHC en se liant aux particules virales (Lavie et al., 2006). Il est important que différentes équipes de l'AC29 collaborent sur le rôle des lipoprotéines dans l'entrée du VHC afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués.
- 9) Entrée du VHB : Il y a très peu d'équipes en France travaillant sur l'entrée du VHB. Il est donc important de renforcer cet axe de recherche en proposant aux équipes travaillant sur ce virus de développer des projets sur cet axe. Actuellement l'équipe de Philippe Gripon développe un axe de recherche sur les récepteurs VHB ainsi que sur le développement de peptides dérivé de la protéine d'enveloppe pour inhiber l'entrée virale.

**Nombre de projets financés par l'ANRS dans le domaine de l'entrée virale (dans le cadre des procédures d'appels d'offres) :**

- Période 2000-2003 : 9 projets
- Période 2004-2005 : 11 projets
- Période 2006 : 8 projets et 2 bourses

## Nombre total de publications dans le domaine de l'entrée virale ayant bénéficié du soutien de l'ANRS :

58 articles publiés dans les revues suivantes : Journal of Virology (20), Journal of Biological Chemistry (9), Journal of General Virology (9), Proceedings of the National Academy of Science (4), Hepatology (4), Biology of the Cell (2), Embo J (1), Journal of Experimental Medicine (1), FASEB Journal (1), J Hepatol (1), Virology, (1), Glycobiology (1), Seminars in Liver Diseases (1), Virol J (1), Curr Issues Mol Biol (1).

## Publications dans le domaine de l'entrée virale ayant bénéficié du soutien de l'ANRS pour la période 2006-7 :

- 1 Lavie M., Goffard A., Dubuisson J. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *In* : Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology, Edited by S.-L. Tan, Horizon Scientific Press, 2006, pp121-150.
- 2 Chapel C, Garcia C, Roingeard P, Zitzmann N, Dubuisson J, Dwek RA, Trépo C, Zoulim F, Durantel D. Study of the antiviral effect of alpha-glucosidase inhibitors on viral morphogenesis and binding properties of hepatitis C virus-like-particles. *J. Gen. Virol.*, 2006, **87**, 861-871. (collaboration inter-laboratoires soutenus par l'ANRS)
- 3 Rouillé Y, Helle F, Delgrange D, Roingeard P, Voisset C, Blanchard E, Belouzard S, McKeating J, Patel AH, Maertens G, Wakita T, Wychowski C, Dubuisson J. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J. Virol.*, 2006, **80**, 2832-2841. (collaboration inter-laboratoires soutenus par l'ANRS)
- 4 Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry : potential receptors and their biological functions. *J. Gen. Virol.*, 2006, **87**, 1075-1085.
- 5 Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouillé Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.*, 2006, **80**, 6964-6972.
- 6 Voisset C, Op de Beeck A, Horellou P, Dreux M, Gustot T, Duverlie G, Cosset FL, Vu-Dac N, Dubuisson J. HDL Reduce The Neutralizing Effect of HCV Infected Patient Antibodies by Promoting HCVpp Entry. *J Gen. Virol.* 2006, **87**, 2577-2581. (collaboration inter-laboratoires soutenus par l'ANRS)
- 7 Dreux M, Pietschmann T, Granier C, Voisset C, Ricard-Blum S, Mangeot PE, Keck Z, Fong S, Vu-Dac N, Dubuisson J, Bartenschlager R, Lavillette D, Cosset FL. (2006) HDL inhibits neutralization by HCV antibodies via ternary interaction with the scavenger receptor BI. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 18285-18295. (collaboration inter-laboratoires soutenus par l'ANRS)
- 8 Helle F, Wychowski C, Vu-Dac N, Gustafson KR, Voisset C, Dubuisson J. Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 25177-25183.
- 9 Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, Bartenschlager R. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2006, **103**, 7408-13.

- 10 Lavillette D, Bartosch B, Nourrisson D, Verney G, Cosset FL, Penin F, Pecheur EI. Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 3909-17. (collaboration inter-laboratoires soutenus par l'ANRS)
- 11 Maillard P, Huby T, Andreo U, Moreau M, Chapman J, Budkowska A. The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB J.*, 2006, **20**, 735-7.
- 12 Komla-Soukha I, Sureau C. A tryptophan-rich motif in the carboxyl terminus of the small envelope protein of hepatitis B virus is central to the assembly of hepatitis delta virus particles. *J. Virol.*, 2006, **80**, 4648-55.
- 13 Lavie M, Voisset C, Vu-Dac N, Zurawski V, Duverlie G, Wychowski C, Dubuisson J. Serum amyloid A has antiviral activity against hepatitis C virus by inhibiting virus entry in a cell culture system. *Hepatology*, 2006, **44**, 1626-1634.
- 14 Barth H, Schnober EK, Zhang F, Linhardt RJ, Depla E, Boson B, Cosset FL, Patel AH, Blum HE, Baumert TF. Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J. Virol.*, 2006, **80**, 10579-90. (collaboration inter-laboratoires soutenus par l'ANRS)
- 15 Diaz O, Delers F, Maynard M, Demignot S, Zoulim F, Chambaz J, Trepo C, Lotteau V, Andre P. Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *J. Gen. Virol.*, 2006, **87**, 2983-91. (collaboration inter-laboratoires soutenus par l'ANRS)
- 16 Boriskin YS, Pecheur EI, Polyak SJ. Arbidol: a broad-spectrum antiviral that inhibits acute and chronic HCV infection. *Viol. J.*, 2006, **3**, 56.
- 17 Lavie M., Goffard A., Dubuisson J. (2007) Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Current Issues in Molecular Biology*. **9**, 71-86.
- 18 Ciczora Y, Callens N, Penin F, Pécheur EI, Dubuisson J. The transmembrane domains of HCV envelope glycoproteins: residues involved in E1E2 heterodimerization and involvement of these domains in virus entry. *J. Virol.*, 2007, sous presse. (collaboration inter-laboratoires soutenus par l'ANRS)
- 19 Chapel C, Garcia C, Bartosh B, Roingard P, Zitzmann N, Cosset FL, Dubuisson J, Dwek RA, Trépo C, Zoulim F, Durantel D. Reduction of the infectivity of hepatitis C virus pseudoparticles by incorporation of misfolded glycoproteins induced by glucosidase inhibitors. *J Gen. Virol.*, 2007, sous presse. (collaboration inter-laboratoires soutenus par l'ANRS)
- 20 Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, Roitelman J, Barbaras R, Graber P, Ghersa P, Smolarsky M, Funaro A, Malavasi F, Larrey D, Coste J, Fabre JM, Sa-Cunha A, Maurel P. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J. Hepatol.* 2007, sous presse.