



Université de Montréal

**Découverte de nouvelles interactions entre le virus de  
l'Hépatite C et l'hôte par une approche combinée de  
Spectrométrie de Masse et de Génomique  
Fonctionnelle**

par

Marie-Anne Germain

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise en biologie moléculaire

Décembre, 2012

© Marie-Anne Germain, 2012

## Résumé

La réplication et l'assemblage du virus de l'hépatite C (VHC) sont régulés finement dans le temps et l'espace par les interactions protéiques entre le virus avec l'hôte. La compréhension de la biologie du virus ainsi que sa pathogénicité passe par les connaissances relatives aux interactions virus/hôte. Afin d'identifier ces interactions, nous avons exploité une approche d'immunoprécipitation (IP) couplée à une détection par spectrométrie de masse (MS), pour ensuite évaluer le rôle des protéines identifiées dans le cycle viral par une technique de silençage génique.

Les protéines virales Core, NS2, NS3/4A, NS4B, NS5A et NS5B ont été exprimées individuellement dans les cellules humaines 293T et immunoprécipitées afin d'isoler des complexes protéiques qui ont été soumis à l'analyse MS. Ainsi, 98 protéines de l'hôte ont été identifiées avec un enrichissement significatif et illustrant une spécificité d'interaction. L'enrichissement de protéines connues dans la littérature a démontré la force de l'approche, ainsi que la validation de 6 nouvelles interactions virus/hôte. Enfin, le rôle de ces interactants sur la réplication virale a été évalué dans un criblage génomique par ARN interférant (ARNi). Deux systèmes rapporteurs de la réplication virale ont été utilisés : le système de réplicon sous-génomique (Huh7-Con1-Fluc) et le système infectieux (J6/JFH-1/p7Rluc2a), ainsi qu'un essai de toxicité cellulaire (Alamar Blue). Parmi les protéines de l'hôte interagissant avec le VHC, 28 protéines ont démontré un effet significatif sans effet de toxicité cellulaire, suggérant fortement un rôle dans la réplication du VHC.

Globalement, l'étude a mené à l'identification de nouvelles interactions virus/hôte et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

**Mots-clés** : Virus de l'hépatite C, Virologie, Interactions virus/hôte, Biologie moléculaire, Spectrométrie de masse, Immunoprécipitation, Criblage génomique, ARNi, Immunophiline, interactions protéine-protéine.

## Abstract

Hepatitis C virus (HCV) replication and assembly are tightly regulated in time and space within the cell, most likely due to protein interactions between virus and host. In order to better understand HCV biology and its pathogenesis, there is a need to unravel virus/host interaction network. We extended our knowledge of virus/host interactions by the identification of cellular proteins associated to HCV proteins using an immunoprecipitation (IP) technique coupled to mass spectrometry (MS), and further evaluate the role of retrieved interactors using gene knockdown.

FLAG-tagged viral proteins Core, NS2, NS3/4A, NS4B, NS5A and NS5B have been expressed individually in 293T human cells, and immunoprecipitated protein complexes have been submitted to MS analysis for identification of host proteins. In this study, 98 proteins were significantly enriched and showed specific interaction to a viral protein. Retrieval of previously characterized interacting proteins proved the strength of the method. Six newly identified interactors by MS were individually confirmed using IP of viral proteins. We evaluated the role of identified interactors in HCV replication by performing a functional lentivirus-based RNA interference (RNAi) screen. Two reporter systems were used: the sub-genomic replicon (Huh7-Con1-Fluc) and a full length infectious clone (J6/JFH-1/p7Rluc2a), as well as the cellular toxicity assay Alamar blue. Of the identified host interactors, 28 proteins showed a significant effect on HCV replication upon gene knockdown and without cellular toxicity.

Overall, the study led to the identification of novel virus/host interactions essential in HCV life cycle and provides novel potential drug targets.

**Keywords :** Hepatitis C virus, Virology, host/virus interaction, Molecular Biology, Mass spectrometry, Immunoprecipitation, Genomic screening, RNAi, Immunophilin, Protein-protein interaction

# TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>CHAPITRE I - INTRODUCTION</b> .....	<b>2</b>
1.1 HISTORIQUE & DÉCOUVERTE DU VIRUS.....	2
1.2 L'ÉPIDÉMIOLOGIE .....	4
1.2.1 <i>Prévalence mondiale</i> .....	4
1.2.2 <i>Modes de transmission</i> .....	4
1.2.3 <i>Maladies associées</i> .....	4
1.3 ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE .....	6
1.3.1 <i>Hépatites Virales</i> .....	6
1.3.2 <i>La Famille Flaviviridae</i> .....	6
1.3.3 <i>Génotypes et Sous-types</i> .....	7
1.3.4 <i>Quasi-espèce</i> .....	9
1.4 STRUCTURE DU VIRUS .....	10
1.4.1 <i>Régions non traduites</i> .....	12
1.4.2 <i>Polyprotéine</i> .....	12
1.4.2.1 <i>Protéines structurales</i> .....	14
1.4.2.1.1 <i>La protéine de capsid Core</i> .....	14
1.4.2.1.2 <i>Les glycoprotéines E1 et E2</i> .....	14
1.4.2.2 <i>Protéines non-structurales</i> .....	15
1.4.2.2.1 <i>La viporine P7</i> .....	15
1.4.2.2.2 <i>L'auto-protéase NS2</i> .....	15
1.4.2.2.3 <i>Le complexe NS3/4A</i> .....	15
1.4.2.2.4 <i>NS4B</i> .....	16
1.4.2.2.5 <i>La phosphoprotéine NS5A</i> .....	17
1.4.2.2.6 <i>L'ARN-polymérase ARN-dépendante NS5B</i> .....	17
1.4.2.2.7 <i>La protéine F</i> .....	17
1.5 CYCLE VIRAL .....	18
1.5.1 <i>Entrée</i> .....	18
1.5.2 <i>Traduction</i> .....	21
1.5.3 <i>Réplication</i> .....	21

1.5.4	<i>Assemblage/Relâche</i> .....	25
1.6	MÉCANISME DE SUBVERSION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE .....	26
1.7	IMPORTANCE DES RELATIONS HÔTE-PATHOGÈNE.....	28
1.7.1	<i>Infectomique</i> .....	28
1.7.2	<i>Études Double Hybride</i> .....	30
1.7.3	<i>Études Génomiques</i> .....	32
1.8	AVENUES THÉRAPEUTIQUES.....	34
1.8.1	<i>Premiers traitements</i> .....	34
1.8.2	<i>Premiers Antiviraux à action directe</i> .....	35
1.8.3	<i>Avenues thérapeutiques futures</i> .....	36
1.8.3.1	Thérapies combinatoires .....	36
1.8.3.2	Antiviraux à action directe .....	37
1.8.3.2.1	Antiviraux ciblant NS3/4A .....	37
1.8.3.2.2	Antiviraux ciblant NS5A .....	38
1.8.3.2.3	Antiviraux ciblant la polymérase NS5B .....	38
1.8.3.2.4	Antiviraux ciblant une autre protéine virale.....	39
1.8.3.3	Antiviraux ciblant l'hôte .....	39
1.8.3.3.1	Inhibiteurs d'entrée.....	40
1.8.3.3.2	Inhibiteurs de réplication - Cyclophiline.....	40
1.8.3.3.3	Inhibiteurs de réplication - PI4KA .....	41
1.8.3.3.4	Inhibiteurs ciblant l'ARN viral .....	41
1.8.3.3.4	Inhibiteurs de la relâche.....	41
1.9	MODÈLES D'ÉTUDE .....	43
1.9.1	<i>Le système du réplicon</i> .....	43
1.9.2	<i>Les pseudo-particules</i> .....	43
1.9.3	<i>Les modèles infectieux de culture cellulaire</i> .....	44
1.9.4	<i>Les modèles de souris</i> .....	44
1.10	HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....	47

**CHAPITRE II: ELUCIDATING NOVEL HEPATITIS C VIRUS/HOST INTERACTIONS USING COMBINED MASS SPECTROMETRY AND FUNCTIONAL GENOMICS APPROACHES..... 50**

**CHAPITRE 3: DISCUSSION..... 97**

3.1	RÉSEAU D'INTERACTIONS.....	97
3.2	IMPLICATION FONCTIONNELLE DES INTERACTIONS.....	104
3.3	PERSPECTIVES .....	106

3.4 CONCLUSION ..... 108

**BIBLIOGRAPHIE..... 109**

**ANNEXE 1- DIRECT-ACTING AND HOST-TARGETING HCV INHIBITORS : CURRENT AND  
FUTURE DIRECTIONS. .... I**



## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Ligne du temps des étapes importantes de la recherche sur le VHC.....	3
Figure 1.2	Estimation de la prévalence du VHC en 2004 selon l’OMS .....	5
Figure 1.3	Arbre phylogénique et origine évolutive du VHC.....	8
Figure 1.4	Organisation génétique de la polyprotéine et des protéines matures du VHC .....	11
Figure 1.5	Topologie membranaire et structure des protéines matures du VHC.....	13
Figure 1.6	Attachement et entrée du virion dans la cellule .....	20
Figure 1.7	Cycle viral du VHC .....	24
Figure 1.8	Mécanismes de subversion de l’immunité innée par le VHC .....	27
Figure 1.9	Représentation du cycle viral, des facteurs de l’hôte importants et des inhibiteurs en développement .....	31
Figure 1.10	Modèles d’étude pour le VHC .....	45
Figure 3.1	Interractions intravirales.....	99
Figure 3.2	Immunoprécipitation de FKBP5 en contexte de réplication virale.....	101
Figure 3.3	Effet de différents gènes sur le VHC.....	105
Figure 3.4	Modélisation des interactions entre le VHC et les rotamases.....	107



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

2'5'OAS	2',5'-Oligoadenylate synthetase
5B-SL3	Structure secondaire de la séquence d'ARN de NS5B
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	Acide déoxyribonucléique complémentaire
ApoB	Apolipoprotéine B
ApoE	Apolipoprotéine E
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférant
BIND	Biomolecular Interaction Network Database
CARDIF	Adaptateur CARD induisant l'IFN $\alpha$
CCR5	Récepteur à C-C chimiokine de type 5
CD81	Cluster de différenciation 81
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CKI	Caseine kinase 1
CLND1	Claudin-1
CsA	Cyclosporine A
CypA	Cyclophiline A
CypB	Cyclophiline B
CVB	Virus coxsackie de groupe B
DAA	Antiviraux à action directe
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DGAT1	Diacylglycerol acyltransferase-1

DRM	Membrane résistante aux détergents
DV	Virus de la Dengue
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
eIF	Facteur eucaryote d'initiation de la traduction
EphA2	Récepteur de l'Ephrin A2
FKBP8	Protéine 8 liant FK506
GAG	Glycosaminoglycans
GBV	Virus GB-B
GO	Gene Ontology
GTP	Guanosine triphosphate
HAART	Highly active anti-retroviral treatment
HTA	Antiviraux ciblant l'hôte
HVR	Région hypervariable
IFN	Interféron
IN	Inhibiteur de nucléoside
INN	Inhibiteur non-nucléoside
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Française
IPA	Ingenuity pathway analysis
IRES	Site d'entrée interne ribosomique
IRF3	Facteur 3 de régulation de l'interféron
ISG	Gène stimulé par l'interféron-I
Jak	Janus kinase
JFH-1	Hépatite fulgurante japonaise

kDa	Kilodalton
LD	Gouttelette de lipides
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LDLR	Récepteurs de lipoprotéines de faible densité
MAVS	Protéine de signalisation antivirale mitochondriale
MINT	Molecular Interaction Database
miR122	Micro-ARN 122
mTOR	Cible moléculaire de la rapamicine
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
MYD88	Gène de réponse primaire à la différenciation myeloïde 88
NANBH	Hépatite non-A non-B
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor
NF- $\kappa$ B	Facteur nucléaire- $\kappa$ B
NS	Protéine non-structurale
nt	Nucléotide
OCLN	Occludin
OMS	Organisation mondiale de la santé
pb	Paire de bases
PCR	Amplification en chaîne par polymérisation
PEG	Polyéthylène glycol
PI4P	Phosphatidyl-inostol 4-phosphate
PI4KA	Phosphatidyl-inositol-4-kinase- $\alpha$
PKR	Protéine kinase R

PRR	Récepteur reconnaissant les motifs de pathogènes
RdRp	ARN-polymérase ARN-dépendante
ER	Réticulum endoplasmique
RIG-I	Hélicase du gène inductible par l'acide rétinoïque-I
Rluc	Luciférase de <i>Renilla reniformis</i>
SR-BI	Récepteur scavenger BI
STAT	Transmetteur de signal et activateur de la transcription
SVR	Réponse virologique soutenue
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNFR	Récepteur de facteur de nécrose tumorale
TRIF	Molécule adaptatrice des récepteurs toll-like
UTR	Région non-transcrite
VAP	Protéine associée aux vésicules
VH	Virus hépatique
VHA	Virus de l'hépatite A
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VHCcc	VHC en culture cellulaire
VHCpp	Pseudo-particule du VHC
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
WNV	Virus du Nil occidental
Y2H	Étude double hybride chez la levure

YB-1      Protéine Y-box binding protein-1  
YFV      Virus de la fièvre jaune

*À mes parrains, marraines, coachs de vie et oreilles  
attentives à mon extériorisation démesurée*



## REMERCIEMENTS

*Tout d'abord, je tiens à remercier Dr. Daniel Lamarre de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche et de m'avoir permis de travailler sur un sujet qui me passionne. Vous m'avez permis beaucoup de libertés tout en m'encadrant et me dirigeant, me permettant ainsi d'acquérir de l'indépendance. Merci Martin Baril, pour m'avoir reçu dans le laboratoire et introduit aux techniques du lab, pour ton aide technique et les discussions de mon (mes) projets. Merci à tous les membres de l'équipe présents et passés, particulièrement Marie-Ève Racine pour ta bonne humeur contagieuse et Nicolas Tremblay pour ton soutien informatique (Geek !) et ton oreille.*

*Laurent Chatel-Chaix, je souhaite te remercier chaudement pour tes coachings scientifiques, personnels et de carrière. Il y a de ces rencontres dans la vie qui vous font grandir, et je te dois beaucoup. Ton esprit critique, ton ardeur et travail et ta générosité font de toi un modèle. Ton énorme patience a été utile pour affronter mes montagnes russes, et je t'en remercie énormément. J'espère travailler avec toi encore un jour !*

*Je tiens aussi à remercier mes superviseurs de stages de m'avoir tant appris et de continuer à me parrainer face à ma carrière, d'être mes mentorats. David Claveau, tu m'as appris une méthode de travail efficace et montré à faire des présentations, et Ghislaine Laraki, Jeff Fortin et Martin Marquis, vous m'avez transmis vos connaissances du milieu de la recherche et de la virologie, merci!*

*Je souhaite également remercier particulièrement les acolytes du lab SM, acteurs et réalisateur du film *The Walking Lab*, et surtout l'équipe du grand défi de Victoriaville: Ed, conseillère conjugale, Cricri, partenaire de swing et chauffeur privé, et Peanut, complice dans le crime.*

*Merci à mon père, cœur sensible, et ma mère, toujours forte, de m'avoir encouragée durant mes études. À mes sœurs, Marjolaine, mère de mon filleul, pour ton grain de folie et ton cœur d'enfant, et Sophie, exemple de courage, détermination, positivisme et de bravoure malgré les épreuves difficiles qui se présentent à toi.*

*Karine, minuscule mais pleine d'énergie, merci de m'avoir suivi pendant plus d'une décennie, tu me connais mieux que personne ! Merci aussi à ma femme, Soanandrianina Pura Vida Rajaona, je t'aime aussi long que ton prénom.*

*Sans toutes ces personnes (désolé pour tous ceux que j'oublie), je ne serais pas celle que je suis, et le chemin jusqu'à la fin de la rédaction de ce mémoire aurait été beaucoup plus dur et certainement moins plaisant. Au risque de me répéter, Merci!*

# **Chapitre 1**

## **Introduction**

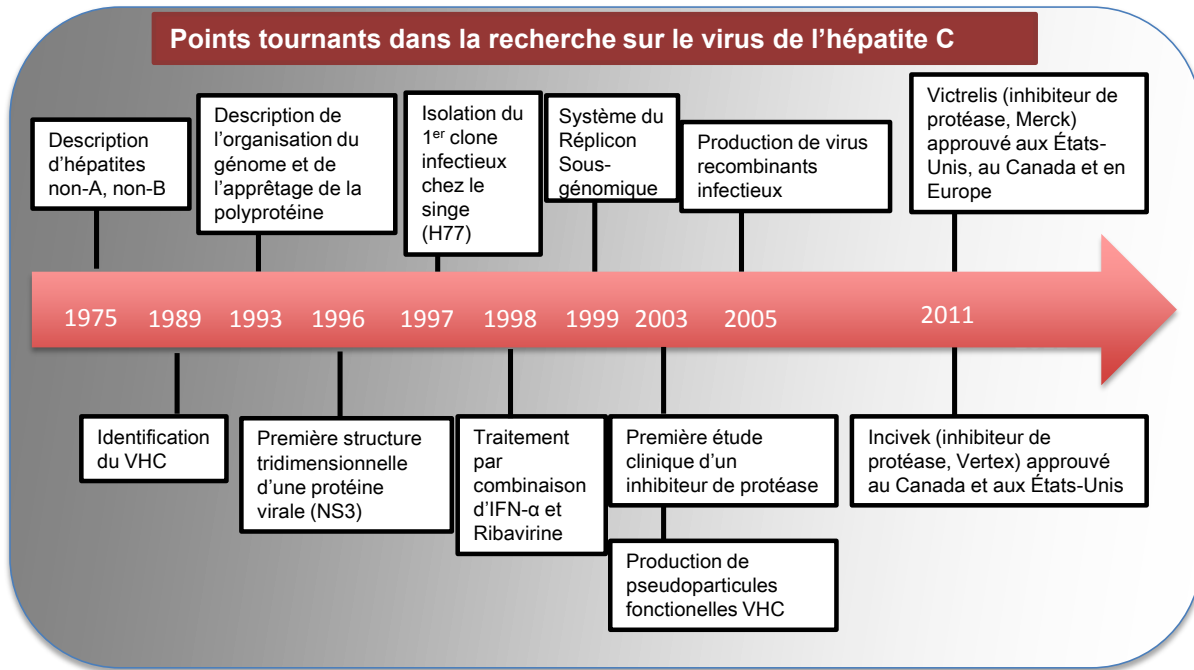


## CHAPITRE I - INTRODUCTION

Cette introduction permettra au lecteur d'apprivoiser les notions de base ainsi que les notions spécifiques concernant le virus de l'hépatite C (VHC), afin de bien cerner la problématique et situer le projet dans le bassin des connaissances actuelles. Une entrée générale concernant l'historique de la découverte du virus précèdera les notions de biologie moléculaire du virus, suivies d'une décortication du cycle répliatif. Ensuite, les notions importantes de relation hôte-pathogène seront abordées, ainsi que le processus d'évasion immunitaire et les systèmes modèles disponibles pour l'étude du VHC. Finalement, les avancées récentes dans le traitement du virus, ainsi que les traitements en développement et les avenues thérapeutiques futures seront développées. L'introduction sera conclue par une hypothèse générale à la base de ce projet de recherche.

### 1.1 HISTORIQUE & DÉCOUVERTE DU VIRUS

Au cours des années soixante, les hépatites de type A et B furent caractérisées et, une décennie plus tard, des tests de détection sérologiques furent mis sur pied. Toutefois, la cause de la plupart des cas d'hépatite ne pouvait être attribuée à aucun de ces deux virus, menant ainsi à l'appellation d'hépatite Non-A Non-B (NANBH) (Feinstone et al., 1975; Houghton, 2009). La caractérisation biochimique fut compliquée par le fait que le virus était présent en titre minime et qu'il était alors impossible de reproduire le cycle viral *in vitro*. L'hypothèse d'un virus enveloppé fut d'abord soulevée par le Dr. Bradley en 1985 (Bradley, 1985), et l'agent pathogène ne fut officiellement identifié en tant que VHC qu'en 1989 (Choo et al., 1989). L'étude du virus fut fastidieuse, et les premiers essais pour la découverte de médicaments exploitèrent le système du réplicon sous-génomique (Lohmann et al., 1999) puisqu'aucun système infectieux n'était encore disponible. Le cycle viral complet ne fut reproduit en laboratoire qu'en 2005, en utilisant une souche isolée d'un patient japonais atteint d'une hépatite fulgurante (*Japanese Fulminant Hepatitis*, JFH-1) (Wakita et al., 2005). Le cheminement historique de la découverte du VHC jusqu'à nos jours est résumé à la figure 1.1



**Figure 1. 1** Ligne du temps des étapes importantes de la recherche sur le VHC

Cet historique présente les faits marquants de la recherche sur le VHC, de la découverte du virus jusqu'aux thérapies, en passant par l'identification officielle en 1989 et les premiers systèmes modèles. Le délai dans l'apparition de traitements spécifiques s'explique en partie par l'absence de systèmes modèles de culture cellulaire permettant la reproduction du cycle viral *in vitro* durant de nombreuses années. (Adapté de (Moradpour et al., 2007))

## 1.2 L'ÉPIDÉMIOLOGIE

### 1.2.1 PRÉVALENCE MONDIALE

Les premières estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS) concernant l'infection par le VHC en 1997 ont un peu changé au niveau de chacun des pays individuellement, toutefois le taux global et les tendances ne semblent pas varier (2004). On estime le taux d'infection global de 2,2 à 3,0 % de la population, soit 130 à 170 millions d'individus. On évalue le nombre de nouvelles infections annuelles à 2,3 à 4,7 millions (Lavanchy, 2009). Le Royaume-Uni et la Scandinavie possède les plus bas taux d'infection, soit de 0,01 à 0,1 %, tandis que les taux les plus élevés sont enregistrés en Égypte, où 15 à 20 % de population est infectée (Alter, 2007). La figure 1.2 représente les données épidémiologiques de l'OMS en 2004, en fonction des pays.

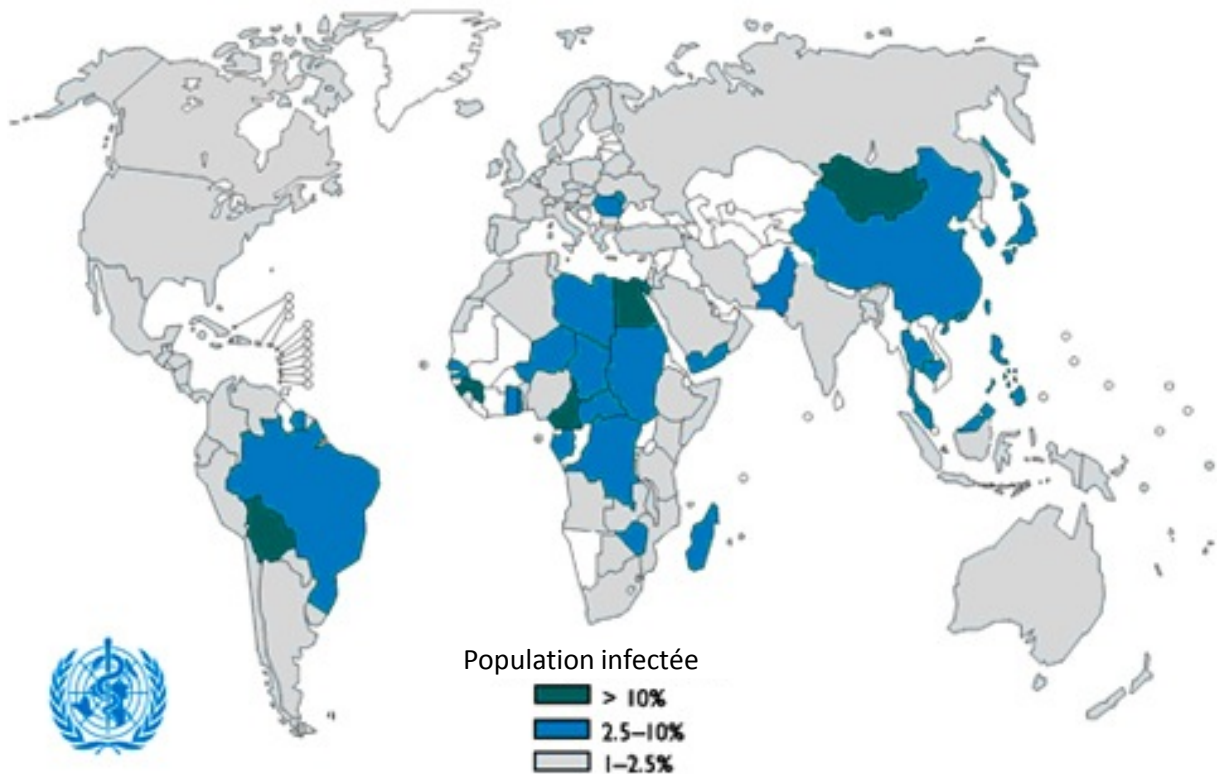
### 1.2.2 MODES DE TRANSMISSION

Les banques sanguines sont maintenant systématiquement testées, mais cette source de contamination était prédominante avant les années 1980. L'usage de drogue injectable via l'échange de seringues souillées est maintenant le mode de transmission le plus fréquent dans les pays développés, et compte pour 40 % des nouvelles infections (1999; Lavanchy, 2009). La propagation par contact sexuel n'est pas fréquente puisque le virus n'est pas transmis efficacement par les muqueuses. Le risque de contamination périnatal est aussi très faible : lorsque le virus est détectable chez la mère lors de l'accouchement, il est de 4 à 7 % (1999; Alter, 2007).

### 1.2.3 MALADIES ASSOCIÉES

Chez certains patients, l'infection est prise en charge par l'organisme et se résorbe d'elle-même. Cependant, entre 50 et 80 % des cas se transforment en infection chronique (2004). Le quart des patients avec une infection chronique développent une cirrhose, et environ 1,6 % développent un carcinome hépatocellulaire (CHC) (2004; Hoofnagle, 1997). Même parmi les pays industrialisés ayant accès aux soins de santé, le taux de mortalité associé au CHC est très élevé, soit 80 % (2004). Globalement, l'infection au VHC est responsable de 27 % des cas de

cirrhose et du quart des cas de CHC (Alter, 2007), ce qui constitue un fardeau médical et économique considérable.



**Figure 1. 2** Estimation de la prévalence du VHC en 2004 selon l’OMS

Les estimés concernant la prévalence de l’infection au VHC ont été recueillis par l’OMS pour surveiller le fardeau global de la maladie (2004). Les données actuelles ne permettent pas d’effectuer un estimé précis, puisque certains pays n’ont pas de données épidémiologiques complètes. L’infection au VHC est plus fréquente dans certains pays d’Amérique du Sud, de l’Asie et de l’Afrique (adapté de (Lavanchy, 2009)).

## 1.3 ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE

### 1.3.1 HÉPATITES VIRALES

Les différents types de virus hépatiques (VH) sont numérotés de A à F, les VHA, VHB et VHC étant les plus communs. Les différents virus hépatiques ne sont toutefois pas membres de la même famille et leur regroupement est simplement dû au fait qu'avant l'avènement de la biologie moléculaire, les maladies étaient classifiées en fonction de leurs symptômes ou de leur tropisme. Le VHA se trouve dans la catégorie IV du code Baltimore (ARN simple brin positif), mais appartient à la famille des *Picornaviridae*. Contrairement au VHC et au VHB, le VHA ne peut produire une infection chronique, et peut être éliminé par le système en 4 à 6 semaines. Le VHB possède un ADN partiellement bicaténaire. Il est classé dans la catégorie VII du code Baltimore et fait partie de la famille des *Hepadnaviridae*. Ce virus, tout comme le VHC, constitue un problème de santé majeur dans les pays en voie de développement étant donné son importante prévalence et puisque 10 % des cas d'infection mènent à une chronicité, pouvant conduire à la cirrhose ou au cancer hépatique. Le VHC possède un ARN simple brin positif, qui peut être directement transcrit en polyprotéine. Le VHC se classe donc, selon le code Baltimore, dans la catégorie IV.

### 1.3.2 LA FAMILLE FLAVIVIRIDAE

Les membres de cette famille partagent des similarités quant à la morphologie, l'organisation du génome et la stratégie de répllication, mais sont aussi très dissemblables en ce qui a trait au tropisme, aux propriétés biologiques et à l'absence de réactivité croisée sérologique.

La famille des *Flaviviridae* regroupe les genres *flavivirus*, *pestivirus*, et *hepacivirus*. Le virus de la fièvre jaune (YFV) fut le premier virus à être découvert, dans les années 1900 (Lindenbach et al., 2007; Reed et al., 2001). Le YFV fait partie du genre des *flavivirus*, qui renferme environ 70 virus essentiellement transmis par les moustiques, dont le virus du Nil occidental (WNV) et le virus de la dengue (DV) (Lindenbach et al., 2007). Le genre des *pestivirus* est beaucoup plus restreint et infecte surtout les mammifères. Le VHC fut longtemps orphelin dans le genre des *hepacivirus*, mais le virus de GB-B (GBV-B),

anciennement connu sous VHG, a été ajouté à la famille en 2005 (CM et al., 2005). Deux autres virus de la famille *Flaviviridae*, GBV-A et GBV-C, restent à ce jour non classifiés.

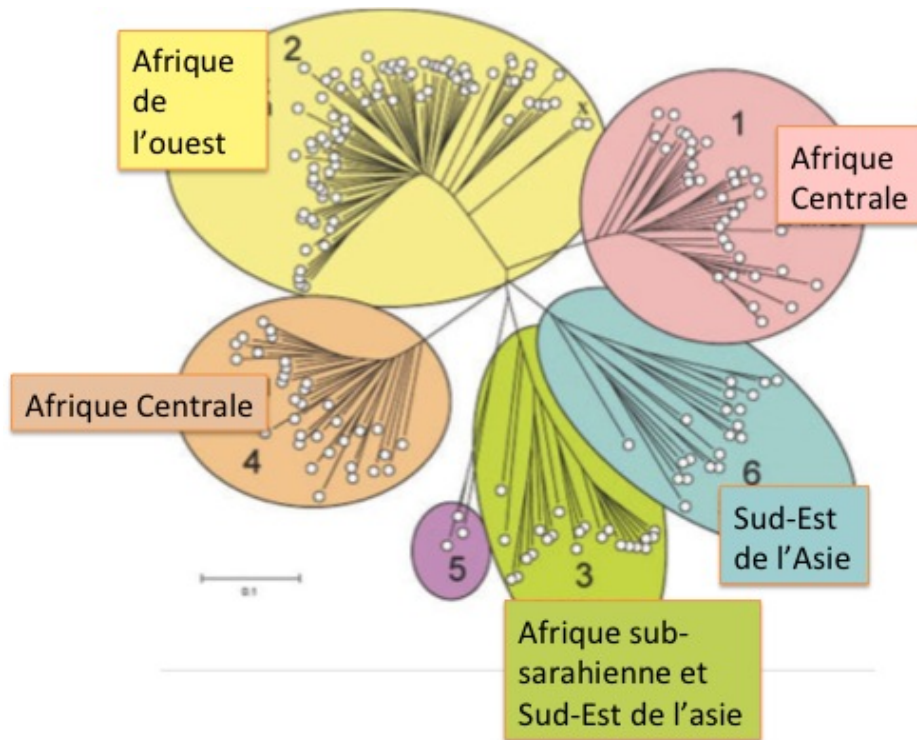
---

### 1.3.3 GÉNOTYPES ET SOUS-TYPES

Lors du 11<sup>e</sup> Symposium sur le VHC et virus associés à Heidelberg en 2004, un groupe d'expert révisa la classification et la nomenclature du VHC. Le consensus résultant de cette rencontre est que les différents génotypes sont notés de 1 à 6 et les sous-types (au nombre de 52) sont identifiés par des lettres minuscules (Simmonds et al., 2005). La séquence d'ARN du VHC est extrêmement variable : elle peut varier de plus de 30% entre chaque génotype et de 20 à 25% entre chaque sous-type. Des recombinaisons inter-génotypes identifiées au sein de groupes à risques (tel que les utilisateurs de drogues injectables) compliquent la classification, mais constituent l'exception (Colina et al., 2004; Kalinina et al., 2004).

Il est intéressant d'observer la distribution géographique de chacun des génotypes en corrélation avec leur origine. Dans les pays occidentaux, les génotypes 1a, 1b, 2a et 2b sont ceux qui sont retrouvés les plus fréquemment. Une grande proportion de ces infections résulte d'une contamination médicale, à l'époque où le dépistage était déficient. Il semblerait que ces sous-types furent amplifiés par l'effet fondateur : un génotype fut rapidement disséminé en Amérique du nord et constitue le génotype prédominant actuel (Simmonds et al., 2005). En Afrique de l'Est, le génotype 2 est prédominant, tandis qu'on retrouve les génotypes 1 et 4 en Afrique centrale et les génotypes 3 et 6 en Asie (Mellor et al., 1995; Simmonds et al., 2005). La figure 3 montre l'arbre phylogénique des génotypes et sous-types, et indique leur provenance.

Il est important de déterminer le génotype et le sous-type lors de la prise en charge d'un patient infecté, puisque chaque génotype répond différemment aux traitements disponibles. Ce sujet sera abordé plus en détail au chapitre 1.8.



**Figure 1.3** Arbre phylogénique et origine évolutive du VHC

L'arbre évolutif représenté ici se base sur l'analyse de séquence de la région 8276 à 8615 encodant la protéine virale NS5B. Les variants peuvent être regroupés dans 6 génotypes distincts, l'éloignement entre chaque génotype ou sous-type symbolise la disparité entre les séquences. Le lieu fondateur de chaque génotype est indiqué. (Adapté de (Simmonds et al., 2005))

---

#### 1.3.4 QUASI-ESPÈCE

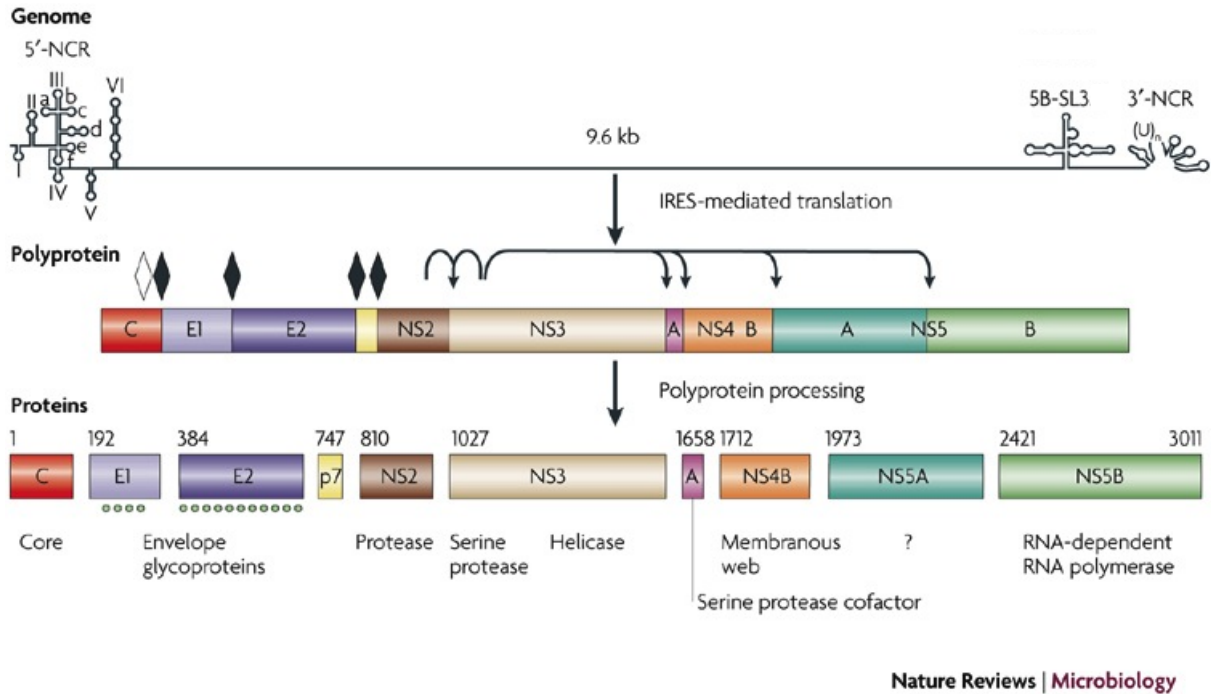
Un patient peut produire jusqu'à  $10^{12}$  virions par jour et la demi-vie d'un virion est de 3 à 4 heures (Neumann et al., 1998). L'ARN viral est copié par l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) NS5B (voir chapitre 1.4.2.2.6) qui possède un taux d'erreur estimé de  $10^{-5}$  à  $10^{-4}$  par nucléotides transcrits (Cuevas et al., 2009; Rong et al., 2010). Pour le génome du VHC de 9600 nucléotides, cela signifie que chaque mutation simple (une mutation dans le génome) ou double (deux mutations à l'intérieur d'un même brin d'ARN) sont possiblement générées chaque jour (Neumann et al., 1998). Plusieurs de ces mutations seront létales pour le virus et ne seront donc jamais détectées chez le patient (Duffy et al., 2008). En raison de cette instabilité génomique, le terme quasi-espèce est utilisé pour désigner les sous-populations hétérogènes de virus retrouvées chez un patient, l'ensemble des quasi-espèces créant la population. La quasi-espèce est en constante évolution à l'intérieur d'un individu, mais le génotype ne change pas. Cette notion de quasi-espèce doit être prise en considération lors du traitement du patient puisqu'elle entraîne l'apparition rapide de mutants de résistance (voir chapitre 1.8).



## 1.4 STRUCTURE DU VIRUS

Le VHC est un virus enveloppé et est principalement composé des protéines Core, E1 et E2, renfermant l'ARN viral (+), qui forment un virion ayant entre 40 et 70 nm de diamètre (Yuasa et al., 1991). Chez l'hôte, la structure des virus en circulation est hétérogène, tel que démontré par essais de flottaison (Bradley et al., 1991). Certains virions sont associés aux lipoprotéines de basse densité (LDL) ou aux lipoprotéines de très basse densité (VLDL), et ces virus constituent la fraction infectieuse (Hijikata et al., 1993). Le virion possède aussi à sa surface des protéines de l'hôte, l'Apolipoprotéine E (ApoE) et l'Apolipoprotéine B (ApoB) qui sont acquises probablement au cours du processus de relâche du virus (Andre et al., 2002; Jiang and Luo, 2009). Ce complexe formé des apolipoprotéines, des triglycérides, de l'ARN et de la capsid, est désigné lipo-viro-particule (Andre et al., 2002). Il y a aussi des évidences démontrant la présence en circulation de virions libres et de virions rattachés à des immunoglobulines (Thomssen et al., 1992).

D'une longueur de 9,6 kb, l'ARN viral est un brin codant (+), constitué de régions non codantes à ses extrémités (UTR) qui encadrent un long cadre de lecture ouvert (ORF) codant pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés (Moradpour et al., 2007). Cette section résumera les propriétés de chacune des régions de l'ARN et des protéines virales matures (figure 1.4).



**Figure 1.4 Organisation génétique de la polyprotéine et des protéines matures du VHC**

Le génome, d'une longueur de 9,6 kb, est d'abord traduit en une seule polyprotéine, précurseur de toutes les protéines virales matures. À ses deux extrémités sont représentées une structure tertiaire simplifiée des régions non-traduites ainsi que celle du 5' de la région codante de NS5B (5B-SL3). Les losanges noirs représentent les sites de clivages peptidiques du précurseur par des signal-peptidases du réticulum endoplasmique, tandis que le losange blanc représente le site de clivage par une enzyme signal peptide-peptidase. Les flèches représentent les sites de clivage de NS3/4A. Les numéros au dessus de chaque protéine virale mature correspondent à l'emplacement du premier acide aminé de la protéine mature au sein de la polyprotéine. Les points sous E1 et E2 indiquent les sites de glycosylation des protéines (tirée de (Moradpour et al., 2007))

---

#### 1.4.1 RÉGIONS NON TRADUITES

La région 5' UTR de l'ARN viral est une région se repliant en une structure secondaire très bien conservée et non permissive à l'apparition de mutants, ce qui concorde avec son rôle essentiel. Cette région de 341 nucléotides se subdivise en 4 domaines, dont les domaines I et II sont nécessaires pour la réplication (Friebe et al., 2001). Elle contient un site interne d'entrée du ribosome (IRES) qui est essentiel pour la traduction de la polyprotéine : comme l'ARN viral ne transite pas par le noyau, il ne possède pas de coiffe (en 5') et de queue poly-A (en 3') autrement nécessaire à la traduction. De plus, le 5'UTR contient deux sites de liaison pour le micro-ARN miR122 hépato-spécifique. Cette hybridation de miR122 à l'ARN viral est essentielle à la traduction et la réplication virale (Jopling et al., 2005).

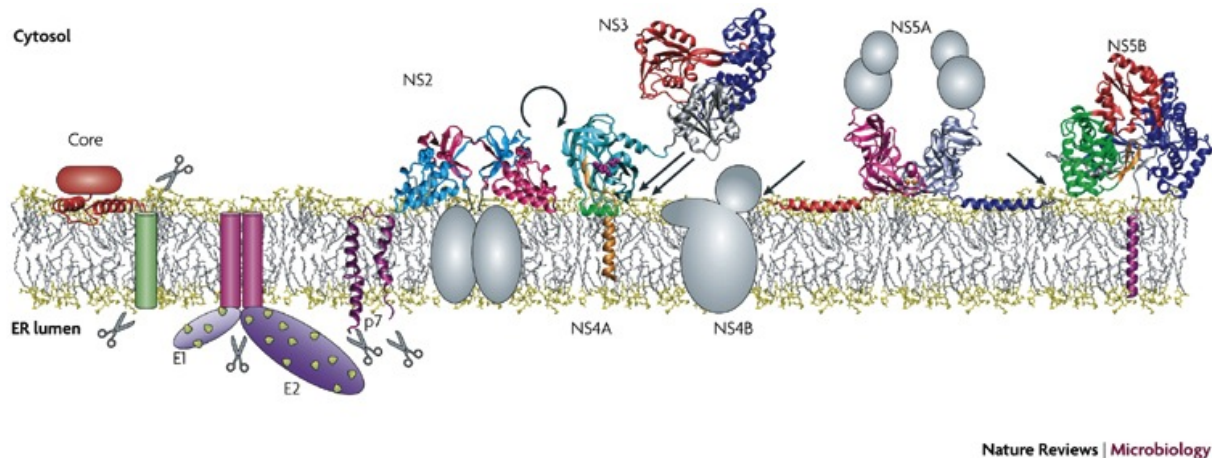
La région 3'UTR est constituée de la région terminale poly-U absolument essentielle à la réplication (Friebe and Bartenschlager, 2002), d'une courte région variable ainsi que d'une région invariable de près de 100 nucléotides, baptisée la queue-X (X-tail), aussi indispensable (Tanaka et al., 1995; Tanaka et al., 1996). De plus, la séquence d'ARN codant pour NS5B produit une structure secondaire appelée 5B-SL3 (NS5B stem-loop 3 *cis*-acting replication element, voir Figure 1.4) (You et al., 2004). La boucle formée par cette structure secondaire interagit avec la boucle de la queue-X de la région 3'UTR pour former une structure tertiaire qui pourrait être nécessaire à la réplication de l'ARN viral (Friebe et al., 2005).

---

#### 1.4.2 POLYPROTÉINE

La traduction du génome viral produit une longue polyprotéine, incluant à son extrémité N-terminale les protéines structurales Core, E1 et E2, suivies des protéines non-structurales (NS), p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. La traduction et le clivage de la polyprotéine sont deux opérations couplées et non séquentielles : il n'existe donc pas de polyprotéine pleine longueur dans la cellule infectée. Le clivage de la jonction entre les protéines Core/E1, E1/E2, E2/p7 et P7/NS2 est effectué par des signal-peptidases de l'hôte (Figure 1.4). Une séquence signal située entre Core et E1 dirige la polyprotéine vers la membrane du ER, et l'ectodomaine de E1 est transloqué dans la lumière du ER (McLauchlan et al., 2002). La protéine Core subit un clivage supplémentaire par une enzyme signal peptide-peptidase. Toutes les autres jonctions inter-protéiques sont clivées par les protéases virales : la

cystéine auto-protéase NS2 clive la jonction entre NS2 et NS3, et la sérine protéase NS3, avec son cofacteur NS4A (NS3/4A) clive toutes les jonctions en aval de celle-ci (Bartenschlager et al., 2004).



**Figure 1.5** Topologie membranaire et structure des protéines matures du VHC

Les structures connues des protéines virales sont représentées sous formes de rubans, les autres par les structures grises, et sont ajustées à l'échelle du ER. Les ciseaux du côté de la lumière du ER indiquent les sites de clivage des peptidases, et les ciseaux du côté cytosolique représentent le site de clivage par la peptide-peptidase. La flèche recourbée représente le site de clivage de la jonction NS2-3, et les flèches droites, les sites de clivage de la protéase virale NS3/4A. (tirée de (Moradpour et al., 2007)

---

#### 1.4.2.1 PROTÉINES STRUCTURALES

Constituants physiques du virion, les protéines structurales sont les premières protéines encodées par l'ARN viral. Core constitue la capsidie contenant l'ARN viral, et E1 et E2 sont des glycoprotéines se trouvant à la surface du virion. (figure 1.5)

---

##### 1.4.2.1.1 LA PROTÉINE DE CAPSIDIE CORE

Tel que mentionné ci-haut, Core est clivée 2 fois. Sa forme mature possède une masse de 19 kDa (la partie clivée est colorée en vert sur la figure 1.5). Cette protéine possède deux hélices hydrophiles et un domaine hydrophobe (en rouge sur la figure 1.5). Le domaine hydrophile N-terminal (D1) est essentiel à la liaison à l'ARN et à l'oligomérisation, phénomènes importants dans l'assemblage du virion (Klein et al., 2005). Chez la cellule infectée, on retrouve Core essentiellement associée aux gouttelettes de lipides (lipid droplets, LD), *via* son domaine central hydrophobe (D2). Néanmoins, Core peut aussi être localisé de façon sporadique à la membrane du ER, à la toile membranaire formée par NS4B, au noyau et à la surface des mitochondries (Boulant et al., 2006; Chang et al., 1994; Santolini et al., 1994; Schwer et al., 2004). Par ses nombreuses interactions avec les protéines de l'hôte, Core est impliquée dans l'évasion du système immunitaire, la signalisation cellulaire, la transcription et l'apoptose (McLauchlan, 2000; Tellinghuisen and Rice, 2002).

---

##### 1.4.2.1.2 LES GLYCOPROTÉINES E1 ET E2

Une fois mures, les glycoprotéines E1 et E2 sont associées au ER par leur domaine C-terminal transmembranaire et sont glycosylées (vert sur figure 1.5) par la machinerie cellulaire (Bartenschlager et al., 2004; Voisset and Dubuisson, 2004). E1 et E2 sont responsables de l'attachement du virus à la cellule et de la fusion des membranes lors du processus d'entrée (voir chapitre 1.5.1).

Les glycoprotéines sont aussi importantes pour la réponse humorale médiée par le système immunitaire. La région hypervariable 1 (HVR1), encodée par les résidus N-terminaux de E2, peut conférer l'immunité tel que démontré chez le chimpanzé. Chez l'humain, une réponse humorale précoce à HVR1 est associée à la clairance virale (Farci et al., 1996; Kato et al., 1992; Zibert et al., 1997).

---

#### 1.4.2.2 PROTÉINES NON-STRUCTURALES

---

##### 1.4.2.2.1 LA VIPORINE P7

Possédant deux domaines transmembranaires dont les extrémités N- et C-terminales sont orientées vers l'intérieur du ER, p7 s'oligomérisent pour former un canal à ion faisant partie de la famille des viporines (présentée sous forme de monomère à la Figure 1.5) (Carrere-Kremer et al., 2002; Griffin et al., 2003). p7 n'est pas essentielle à la réplication de l'ARN, mais elle est indispensable à la formation de particules virales et à leur relâche (Sakai et al., 2003). Il a aussi été suggéré qu'elle serait un constituant du virion, mais cette hypothèse soulève la controverse (Griffin et al., 2008; Steinmann et al., 2007).

---

##### 1.4.2.2.2 L'AUTO-PROTÉASE NS2

Quoique non-essentielle pour la réplication *in vitro*, la cystéine-protéase NS2 est indispensable à l'obtention d'un cycle viral infectieux dans un modèle réplicatif (Kolykhalov et al., 2000; Welbourn et al., 2005). NS2 est représenté sous forme d'hétérodimère à la figure 1.5, le domaine catalytique en cyan et magenta et le site actif sous forme de sphères. L'activité catalytique de NS2 réside dans sa partie C-terminale, et elle clive NS3 pour en faire une molécule active. Ce clivage nécessite la dimérisation de NS2-3, mais est indépendant de la fonction protéase de NS3. NS2 interagit aussi avec d'autres protéines virales, tel que E1, E2, p7, NS3/4A et NS5A (Kiiver et al., 2006; Phan et al., 2009; Selby et al., 1994). Récemment, des études ont démontré que NS2, par ses interactions, joue un rôle crucial dans l'assemblage ainsi que la relâche du virus à une étape précoce de la voie de sécrétion (Jirasko et al., 2010; Stapleford and Lindenbach, 2011). Ces études démontrent ainsi un lien entre les protéines structurales et non-structurales dans l'organisation de l'assemblage et de la relâche du virus.

---

##### 1.4.2.2.3 LE COMPLEXE NS3/4A

La protéine NS4A agit en tant que cofacteur de NS3. Ce complexe possède deux activités enzymatiques majeures : l'activité sérine protéase est située dans le tiers N-terminal de NS3 (Cyan, figure 1,5), tandis que l'activité hélicase/NTPase est située dans la partie C-terminale (bleu, rouge et argenté, figure 1,5). Le complexe est bien caractérisé et la structure tridimensionnelle est disponible (voir Figure 1.5). La protéine NS4A est responsable de

l'ancrage au ER et est une composante de l'activité enzymatique sérine protéase, de concert avec NS3. En plus de sa localisation au ER, une petite fraction se localise à la surface des mitochondries (Wolk et al., 2000).

L'activité protéase du complexe NS3/4A requiert un ion  $Zn^{2+}$  et clive les jonctions NS3/4A en *cis*, ainsi que les jonctions NS4A/4B, NS4B/5A et NS5A/5B. De plus, cette protéase joue un rôle important dans l'établissement de la persistance virale puisqu'il antagonise les défenses immunitaires innées. Afin de bloquer l'activation d'IRF-3 et de NF- $\kappa$ B, NS3/4A clive les protéines adaptatrices essentielles à l'immunité antivirale innée TRIF et MAVS en amont de la voie de signalisation, fort probablement par la portion de protéines NS3/4A localisé à la mitochondrie (Li et al., 2005; Meylan et al., 2005). Cet aspect sera abordé en plus de détails à la section 1.6.

La fonction ATPase/hélicase du complexe NS3/4A sert à dérouler l'ARN double brin ou simple brin. L'hélicase du VHC fait partie de la superfamille des DExH/D-box hélicases, et est similaire à d'autres hélicases de la famille des *Flaviviridae* (Caruthers and McKay, 2002). Enfin, des études récentes démontrent que ce domaine hélicase joue un rôle important dans l'assemblage, indépendamment de ses fonctions enzymatiques (Ma et al., 2011; Phan et al., 2009).

Cette multifonctionnalité de NS3/4A en fait donc une cible de prédilection pour le développement d'antiviraux. D'ailleurs, l'activité protéase est la cible des antiviraux commerciaux Invicek et Victrelis (voir chapitre 1.8.2).

---

#### 1.4.2.2.4 NS4B

Cette protéine est peu caractérisée, mais occupe une fonction centrale pour la réplication du virus. Elle possède quatre domaines transmembranaires, est palmitoylée en C-terminal et forme un oligomère (Yu et al., 2006). À elle seule, elle induit un changement morphologique important dans la cellule, appelé la toile membranaire (membranous web) (Egger et al., 2002). Cette toile, situé entre le ER, rassemble des mitochondries et des LD, et constitue l'échafaudage nécessaire à la réplication virale.

---

#### 1.4.2.2.5 LA PHOSPHOPROTÉINE NS5A

Cette phosphoprotéine existe sous deux formes: phosphorylée de base, avec un poids d'environ 56 kDa, ou hyperphosphorylée, avec un poids de 58kDa. Cette phosphorylation est attribuée à la kinase cellulaire CKI (Evans et al., 2004; Quintavalle et al., 2006). La protéine est ancrée à la membrane du ER par une hélice amphiphile en N-terminal (Figure 1.5). Trois domaines ont été identifiés et le domaine I possède une structure dimérique qui pourrait être impliquée dans l'interaction avec l'ARN ou les protéines cellulaires et virales (Tellinghuisen et al., 2004; Tellinghuisen et al., 2005). Cette phosphoprotéine est bien conservée chez les *Flaviviridae*, elle est donc très importante pour le cycle viral (Reed et al., 1998). Bien qu'on en sache peu sur la fonction de cette protéine, plusieurs de ses interactants ont été étudiés en détails, dont la protéine phosphatidyl-inositol-4-kinase- $\alpha$  (PI4KA) (Berger et al., 2011). Ces interactions et leurs implications seront abordées plus en détails dans la section 1.5.2.2 (Figure 1.9).

---

#### 1.4.2.2.6 L'ARN-POLYMÉRASE ARN-DÉPENDANTE NS5B

Afin de répliquer son génome, le virus doit produire un brin anti-sens (-) à partir de son brin sens (+). Ce brin à polarité négative sert ensuite de modèle pour la production de brins sens. La RdRp NS5B est responsable de cette fonction chez le VHC, et possède la structure classique dite 'main', avec un domaine pouce, un domaine paume et un domaine doigt (Figure 1.5, vert, rouge et vert, respectivement) (Lesburg et al., 1999). Les résidus catalytiques sont situés dans le domaine paume et enlignent le brin d'ARN et les nucléotides (van Dijk et al., 2004). La partie C-terminale est responsable de l'attachement à la membrane du ER et cet ancrage est essentiel à la réplication (Lee et al., 2004; Yamashita et al., 1998).

---

#### 1.4.2.2.7 LA PROTÉINE F

Cette protéine est produite par un cadre de lecture alternatif résultant d'un changement de cadre de lecture programmé du ribosome (Branch et al., 2005). Bien que les anticorps contre cette protéine retrouvés chez les patients infectés prouvent son existence, le fait qu'elle ne soit essentielle ni à la réplication *in vitro* ou *in vivo* suggère que son rôle, si elle en a un, est peu important (McMullan et al., 2007).



## 1.5 CYCLE VIRAL

Le cycle viral peut se diviser en grandes étapes : l'entrée dans la cellule (de l'attachement du virion à la surface jusqu'à la décapsidation de l'ARN dans le cytoplasme), la traduction, la réplication, et enfin l'assemblage et la relâche. Dans cette section, les grandes lignes de ces étapes seront décrites.

### 1.5.1 ENTRÉE

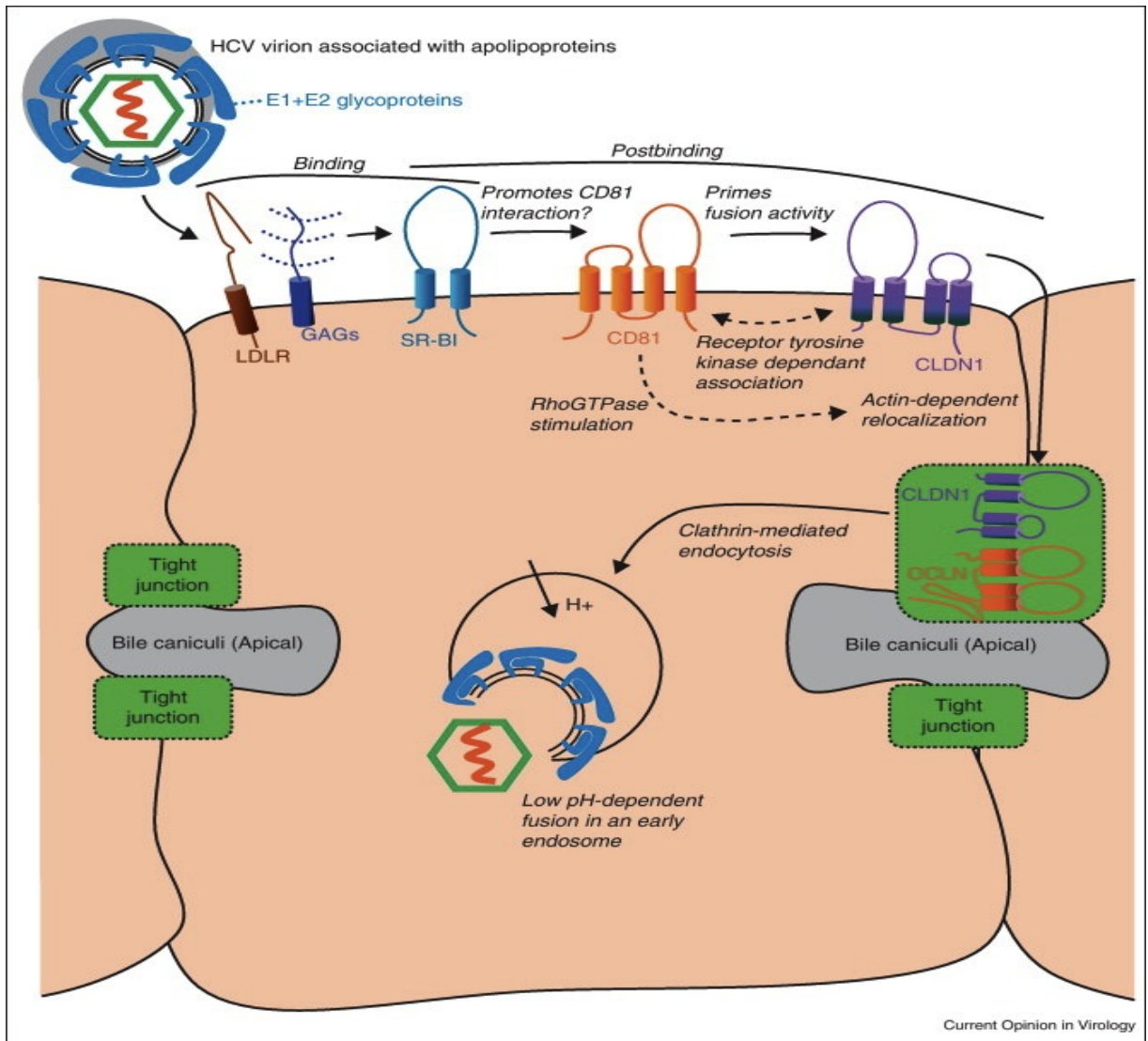
L'entrée dans la cellule hôte est un processus séquentiel impliquant plusieurs facteurs de l'hôte. L'attachement, l'internalisation et la relâche du contenu viral dans la cellule sont les trois étapes principales. (Figure 1.6)

Tout d'abord, l'attachement à la cellule requiert plusieurs interactions avec les molécules de surface de l'hôte. L'attachement initial à la cellule est imputable aux glycosaminoglycanes (GAG) et aux récepteurs de lipoprotéines de faible densité (LDLR) (Barth et al., 2003; Monazahian et al., 1999). Certaines études démontrent que c'est suite à cet attachement initial de faible affinité que survient l'attachement au récepteur SR-B1 (*scavenger receptor class B type-1*) (Catanese et al., 2010; Catanese et al., 2007). Tel que démontré par des études de blocage de l'entrée par des anticorps spécifiques, CD81 est aussi nécessaire à l'attachement du virion (Koutsoudakis et al., 2006). De plus, CD81 interagit avec une forme soluble de E2, mais l'attachement *in vivo* nécessite un ancrage antérieur à celui-ci, possiblement par un changement de conformation dans la structure du virion nécessaire à l'exposition de sites d'attachements à CD81 (Bitzegeio et al., 2010). La temporalité de l'attachement à Claudin 1 (CLDN1) n'est pas encore bien connu, mais surviendrait juste avant l'internalisation, ou en même temps que l'interaction avec CD81. (Evans et al., 2007; Krieger et al., 2010). Claudin 6 et 9 peuvent aussi être impliquées dans le processus d'attachement (Meertens et al., 2008; Zheng et al., 2007). Occludin (OCLN) est aussi un facteur important, mais on explique mal comment deux protéines des jonctions serrées, CLDN1 et OCLN, peuvent être importantes à l'internalisation.

Récemment, trois nouveaux facteurs importants pour l'entrée du VHC ont été identifiés. Deux récepteurs tyrosine kinase, le récepteur EphA2 (Ephrin receptor A2) et EGFR

(Epidermal growth factor receptor), ont été identifiés dans un criblage par ARN interférant (ARNi) (Lupberger et al., 2011). De plus, l'expression du récepteur Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor (NPC1L1) est nécessaire à l'infection *in vivo* (Lupberger et al., 2011).

Une fois attaché à la surface cellulaire, le virus entre dans la cellule *via* une endocytose dépendante de la clathrine (Blanchard et al., 2006). Le virion effectue un passage par les endosomes de bas pH, ce qui induit la fusion des membranes et la relâche de la capsid dans le cytosol (Koutsoudakis et al., 2006; Tscherne et al., 2006). L'ARN viral est ensuite relâché dans le cytosol afin d'être traduit et répliqué.



**Figure 1.6** Attachement et entrée du virion dans la cellule

Schéma du chemin potentiel d'entrée du virus dans des hépatocytes polarisés, en basant se sur la localisation des cofacteurs d'entrée du VHC et sur des similitudes observées chez le coxsackievirus de groupe B (CVB). (Adapté de (Ploss and Evans, 2012))

---

### 1.5.2 TRADUCTION

Une fois libéré dans le cytosol, l'ARN viral doit être transcrit, puis la polyprotéine est clivée pour former les protéines matures. La Figure 1.7 montre, de façon simplifiée, le cycle viral de l'entrée à la relâche. Cette section parlera de la traduction de la protéine ainsi que du complexe de réplication.

Les domaines II, III et IV de la région 5'UTR ainsi que les premiers nucléotides de la région codant pour Core constituent le site d'entrée interne du ribosome (IRES). La sous-unité 40S du ribosome se lie à l'IRES, recrute le facteur d'initiation eucaryotique de la traduction (eIF3) et le complexe ternaire (eIF2a ainsi que l'ARN de transfert initiateur couplé à une GTP) constituant le complexe 48S-like au codon initiateur AUG. La sous-unité 60S s'associe enfin au complexe pour former le complexe 80S, le ribosome actif en traduction/élongation (Otto and Puglisi, 2004).

Récemment, un micro-ARN (miR122), exprimé exclusivement dans les cellules hépatiques, a été découvert comme étant important au cycle viral (Henke et al., 2008). Contrairement au mécanisme d'inhibition généralement proféré par les micro-ARN, la liaison entre miR122 et la région 5'UTR de l'ARN viral accentue la traduction et la réplication virale et est absolument essentielle au cycle viral (Chang et al., 2008; Henke et al., 2008).

---

### 1.5.3 RÉPLICATION

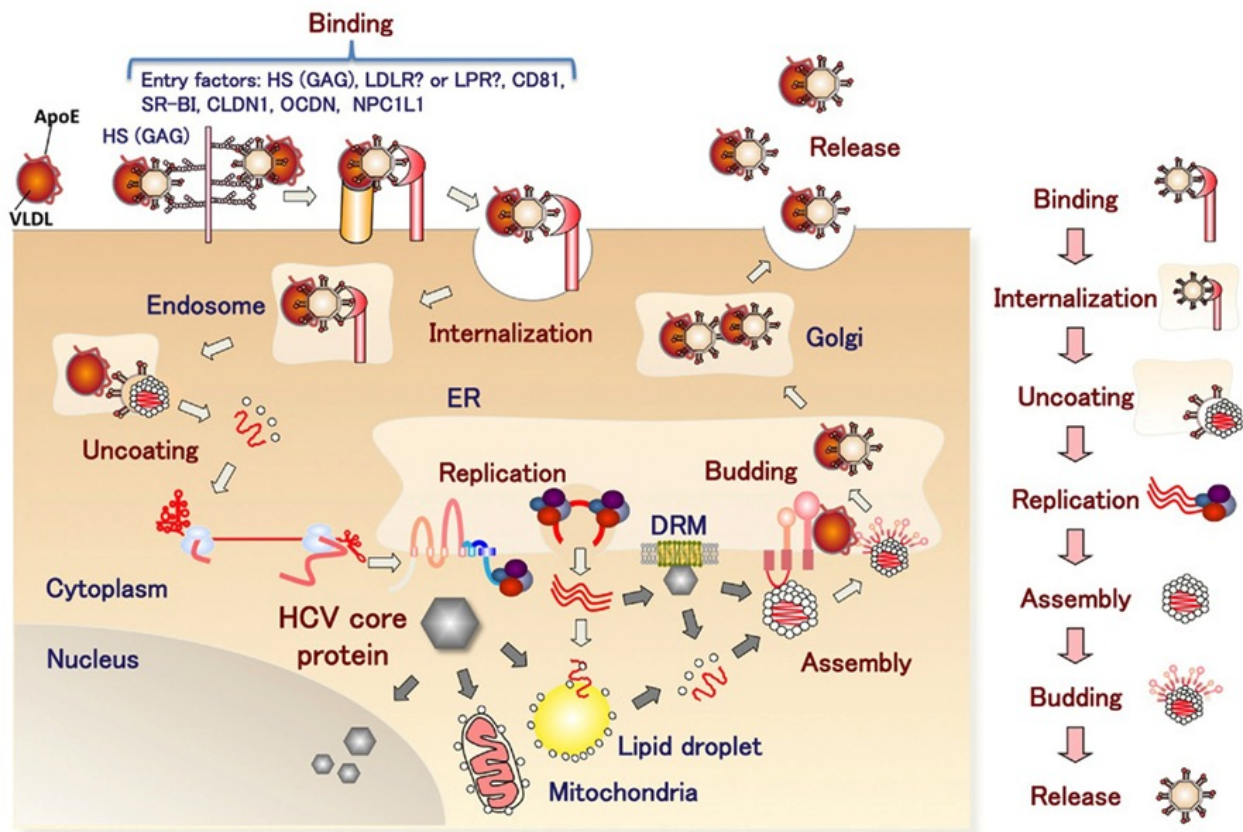
La formation d'un complexe de réplication est essentielle au support physique de l'amplification de l'ARN viral, puisqu'il permet un cloisonnement de la réaction et l'augmentation locale de composants nécessaires à la réplication virale (Schwartz et al., 2002). L'infection au VHC produit dans la cellule une altération membranaire caractéristique, appelée la toile membranaire (Egger et al., 2002). Tel qu'abordé précédemment, la protéine virale NS4B à elle seule peut induire la formation d'une structure similaire, dérivée du ER et en rapprochement étroit avec les gouttelettes lipidiques (LD). On réfère aussi à cette structure formée de la toile membranaire en tant que membrane résistante aux détergents (DRM) (Matto et al., 2004).

En 2003, le groupe de Shimotohno observa que la réplication virale était inhibée par la cyclosporine A (CsA) (Watashi et al., 2003). La cyclophiline B (CypB), interagissant de la polymérase virale, fut identifiée comme étant la cible de la CsA. CypB agit en tant que promoteur de l'interaction entre NS5B et l'ARN (Watashi et al., 2005). Cette interaction est ciblée par la CsA. Plus tard, d'autres groupes ont démontré que l'interaction entre Cyclophiline A (CypA) et NS5A est au moins aussi importante et que des mutants de résistance à la CsA apparaissent dans les protéines NS5A et NS5B (Chatterji et al., 2009; Koch et al., 1996; Yang et al., 2008). Les immunophilines possèdent la même activité peptidyl-propyl *cis-trans* isomérase que les cyclophilines et l'une d'entre elles, FKBP8, forme un complexe avec NS5A. Le silencage de FKBP8 compromet la réplication virale (Okamoto et al., 2006). De surcroît, une étude a démontrée qu'en liant FKBP8, NS5A compétitionne avec mTOR et en réduit ainsi l'interaction, puisque la signalisation mTOR est donc activée, et cela augmente la survie cellulaire (Peng et al., 2010).

Des criblages génomiques par ARNi ciblant la réplication du VHC ont identifié la PI4KA comme étant essentielle au cycle viral et ce, par plusieurs groupes indépendants (Borawski et al., 2009; Li et al., 2009; Tai et al., 2009; Trotard et al., 2009; Vaillancourt et al., 2009). En contexte infectieux, PI4KA est localisé au complexe de réplication avec NS5A et l'ARN viral. L'activité enzymatique de cette molécule est mise à profit par le virus afin de créer un environnement enrichi en phosphatidylinostol 4-phosphate (PI4P) indispensable à l'intégrité de la toile membranaire et à l'activité des complexes de réplication (Bianco et al., 2012).

Les protéines associées aux protéines membranaires associées aux vésicules (VAMP-associated) jouent un rôle dans le trafic des vésicules, ainsi que des céramides et du cholestérol entre l'appareil de golgi et le ER. Des expériences d'immunoprécipitation ont révélé que NS5A et NS5B se lient à VAP-A et VAP-B (Hamamoto et al., 2005; Tu et al., 1999). De plus, VAP-A est localisé aux complexes de réplication dans la cellule infectée et l'insertion d'un dominant négatif de VAP-A supprime la réplication virale (Gao et al., 2004). Ces protéines ont aussi été identifiées dans un criblage ARNi, démontrant ainsi leur importance dans la réplication virale (Randall et al., 2007).

Dans notre laboratoire, une protéine de l'hôte a été identifiée en tant qu'interactant de NS3/4A et joueur important dans la réplication. Il s'agit de la protéine Y-box binding protein-1 (YB-1). En plus d'avoir démontré une interaction entre les deux protéines, il a été montré que YB-1 est relocalisé aux gouttelettes lipidiques lors de l'infection virale. Au niveau fonctionnel, cette protéine a deux rôles bien distincts. Des expériences de silençage ont montrées que YB-1 est un régulateur positif de la réplication virale, et que cette protéine limite la production de particules virales. Cette protéine, ou le complexe auquel elle appartient, est donc importante dans l'équilibre entre la réplication et l'assemblage du virus (Chatel-Chaix et al., 2011).



**Figure 1.7** Cycle viral du VHC

L'entrée dans la cellule se produit *via* les facteurs d'attachement de l'hôte et l'endocytose. Suite à la décapsidation, l'ARN viral est transporté vers la toile membranaire, où il est répliqué. L'assemblage et la sécrétion se fait en étroite association avec la voie de sécrétion des VLDL. (Tirée de (Moriishi and Matsuura, 2012))

---

#### 1.5.4 ASSEMBLAGE/RELÂCHE

Lors de la réplication virale, le nouveau brin d'ARN (+) sort de la toile membranaire et se dirige, en collaboration avec la phosphoprotéine NS5A, vers la protéine Core se situant à la surface des LD (Masaki et al., 2008). L'activité de multimérisation de Core encapside l'ARN (+), puis une membrane endoplasmique contenant E1 et E2 enrobe la capsid (Boson et al., 2011; Miyanari et al., 2007). À cette étape, le virus est situé du côté de la lumière du ER. Les étapes d'assemblage et de maturation sont dépendantes des protéines de l'hôte ApoE, ApoB et MTP (microsomal triglyceride transfer protein) (Gastaminza et al., 2008). La sécrétion des virions est peu caractérisée, mais on croit qu'elle est liée à la voie de sécrétion des VLDL (Huang et al., 2007). De récentes études démontrent que la relâche dépend aussi de la protéine de l'hôte DGAT1 (diacylglycerol acyltransferase-1) qui agit avec Core et le relocalise aux LD, un phénomène essentiel à la production de virus (Gastaminza et al., 2008; Herker et al., 2010)

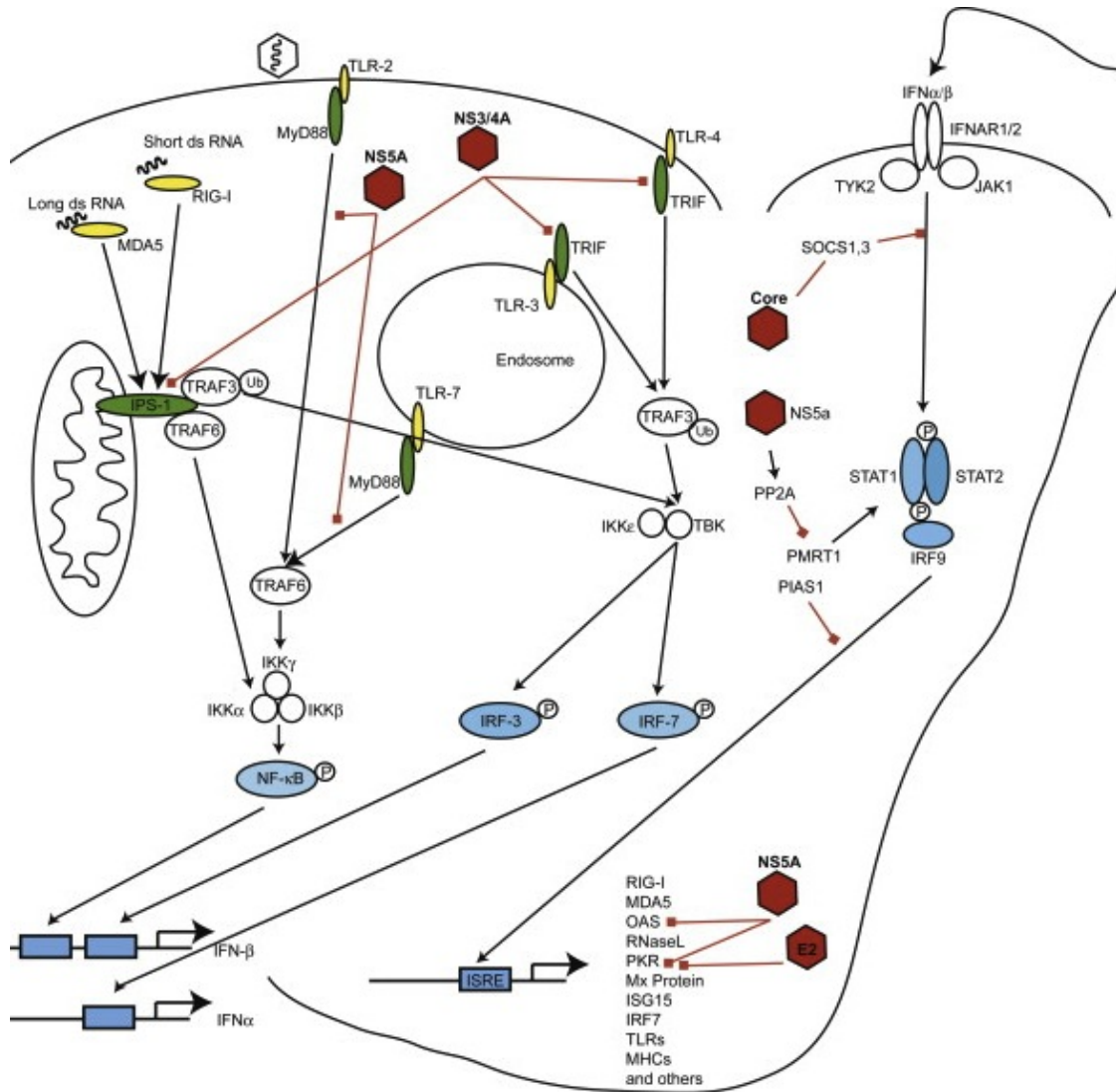
L'assemblage et la relâche nécessitent la coopération de plusieurs protéines virales. NS2 interagit avec p7, E2 et NS3/4A au ER, ainsi que NS3/4A (Counihan et al., 2011; Popescu et al., 2011). P7 module le pH des vésicules intracellulaires, et une mutation dans cette protéine altère la capacité du virus à produire des virions (Popescu et al., 2011).



## 1.6 MÉCANISME DE SUBVERSION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

La cellule possède plusieurs mécanismes de reconnaissance et de défense contre l'envahisseur viral. En réponse à l'infection par le VHC, il y a une forte induction d'IFN de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et des gènes stimulés par l'interféron (ISG). Cette réponse débute par la détection de l'envahisseur par les récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR) (Gale and Foy, 2005). Dans le cas du VHC, les récepteurs RIG-I, Toll-like récepteur (TLR)-1, -3 et -7 sont les joueurs clé de la reconnaissance, et transmettent le signal par les protéines adaptatrices TRIF, MYD88 et MAVS. Ces effecteurs activent les facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- $\kappa$ B, qui sont ensuite transloqués vers le noyau afin d'activer la transcription d'IFN, dont la sécrétion enverra un signal d'alerte aux cellules avoisinantes. L'IFN sécrété est détecté par les récepteurs d'interféron, le message est transmis par la voie JAK/STAT et la transcription d'ISG, tel que les cytokines inflammatoires, les récepteurs de reconnaissance de motifs et les protéines effectrices (Gale and Foy, 2005).

Le VHC utilise plusieurs stratégies pour se cacher des systèmes de défenses immunitaires innées et acquises afin de pouvoir établir une infection virale persistante. Le mécanisme de subversion de l'immunité du VHC le mieux caractérisée est l'action protéase de NS3/4A qui inhibe les voies de signalisation RIG-I et TLR3 en clivant MAVS et TRIF (Meylan et al., 2005). Core joue également un rôle important en inhibant la signalisation JAK/STAT et en induisant la production de suppresseur de signalisation des cytokines (SOCS1 et SOCS3) (Lin et al., 2006). De plus, les protéines virales E2 et NS5A inhibent PKR, alors que NS5A atténue l'expression d'IL-8 et 2'5'OAS. Malgré tous ces mécanismes de subversion, une activation de la voie IFN est détectée chez les patients et s'expliquerait par le fait ce ne sont pas tout les hépatocytes qui sont infectés ou que le signal est induit avant la production des protéines virales (Loo et al., 2006). Ces mécanismes sont collectivement représentés à la Figure 1.8.



**Figure 1.8 Mécanismes de subversion de l'immunité innée par le VHC**

Les protéines virales (représentées par les octogones rouges) inhibent les voies de signalisation de l'immunité innée. L'ARN viral est reconnu par les récepteurs de reconnaissance de motifs (en jaune, RIG-I et MDA5). Les protéines adaptatrices (MAVS et TRIF, en vert) transmettent le signal aux kinases (en bleu) qui activent les facteurs de transcription. Transloqués au noyau, ceux-ci activent la production de ISG. (Adapté de (Joyce and Tyrrell, 2010))

## 1.7 IMPORTANCE DES RELATIONS HÔTE-PATHOGÈNE

Dans les sections précédentes, il a été inévitable de parler des relations entre l'hôte et le virus afin d'expliquer la biochimie du virus et son cycle répliatif. Le VHC possède un matériel génétique condensé, codant pour dix protéines seulement et constituant toute l'information nécessaire pour l'infection. Il est donc nécessaire pour lui de détourner les protéines de l'hôte et en tirer profit afin de compléter son cycle infectieux. Plusieurs exemples bien connus dans la littérature ont été décrits dans les sections précédentes, tel que : CD81, OCLN CLDN, NPC1L1, EGFR, EphA2 pour l'entrée; PI4KA, VAP-A, VAP-B, YB-1, CyPA, CyPB, miR122 et FKBP8 pour la traduction et la réplication et DGAT1, MTP, ApoE et ApoB pour l'assemblage et la relâche. Près de 500 interactions ont été rapportés, mais peu sont décrites fonctionnellement voire même confirmées. Plusieurs autres restent aussi à découvrir. La caractérisation du rôle de ces interactions dans le cycle de réplication viral et leur compréhension sont essentielles afin de mieux comprendre la biologie du virus. (Figure 1.9) En raison de l'émergence rapide de mutations lors de thérapies ciblant les protéines virales, une alternative intéressante est de cibler les protéines de l'hôte, ou encore mieux, l'interface d'interaction entre la protéine virale et l'hôte. Cet aspect sera décrit à la section suivante. Dans l'optique de l'approche par biologie des systèmes du projet, les thèmes d'infectomique, d'interactome, d'études de double-hybrides et les études de criblage en génomique fonctionnelle seront abordés afin de situer les connaissances actuelles sur le sujet.

---

### 1.7.1 INFECTOMIQUE

Au cours des dernières années, la quantité de données générées par les nouvelles approches à haut débit a donné naissance aux études dites -omiques, référant à l'étude des structures d'ensembles d'éléments (le suffixe -ome est tiré du sanscrit OM, signifiant complétude, et désigne les ensembles d'éléments). Par exemple, l'étude du génome, regroupant l'ensemble des gènes, a mené aux études génomiques. Il en est de même pour la protéomique, métabolomique, etc. Ainsi, on réfère à l'ensemble des interactions entre un pathogène et son hôte en tant qu'infectome. La compréhension globale du système tenant en compte de l'ensemble des molécules et de leurs interactions moléculaires et fonctionnelles, nommé infectomique, permet une étude systémique du virus.

Lorsqu'on étudie un réseau d'interaction protéine-protéine, on mesure le niveau de proximité des protéines dans un réseau (mesure du parcourt le plus succinct entre deux protéines). De ces études, il est possible de faire ressortir des voies fonctionnelles potentielles. De plus, en modélisant mathématiquement le réseau, deux types de protéines plus intéressantes peuvent ressortir : les 'hub' ou les 'bottleneck'. Les 'hub' correspondent aux protéines hautement connectées, jouant un rôle central. Les 'bottleneck' sont faiblement connectés mais occupent une position vers laquelle les interactions convergent, sorte de 'goulot d'étranglement' par lequel l'information doit nécessairement cheminer, ou encore un pont moléculaire entre deux processus biologiques. Des études du réseau du VHC dans un contexte cellulaire montre une préférence envers les 'hub' et les 'bottleneck' (Navratil et al., 2010).

Des outils bioinformatiques ont été développés en parallèle à l'avènement des approches -omiques, afin d'intégrer les informations et leur donner un sens au niveau fonctionnel. Des bases de données sont disponibles sur internet afin de consulter les données des réseaux d'interactions cellulaires, tel que le Molecular Interaction Database (MINT), développé par l'Université de Rome Tor Vergata, (Ceol et al., 2010), IntAct, rendu disponible par l'Institut de Bioinformatique européen (EMBL-EBI (Kerrien et al., 2012)), le Biomolecular Interaction Network Database (BIND (Bader et al., 2001)) ou encore le programme Ingenuity Pathway Analysis (IPA), disponible sous licence commerciale. Des outils appliqués à l'étude des virus sont aussi disponibles : VirusMINT, l'alter égo de MINT à l'échelle virale, VirHostNet, développé par l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Française (INSERM) (Navratil et al., 2009), ou encore HCVpro, spécifique au VHC développé par l'Université de Western Cape (Kwofie et al., 2011).

Enfin, certains programmes plus spécifiques permettent d'identifier les termes spécifiques enrichis d'un groupe de gènes (Gene ontology, GO terms), afin d'en révéler la fonction moléculaire, la localisation cellulaire, ou le processus biologique associé. Cette recherche peut être faite par le programme IPA, ou gratuitement sur site web DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, (Dennis et al., 2003)).

Les approches holistiques, c'est-à-dire les connaissances découlant de l'étude du système d'interactions et de ses composants, viendront renforcer les analyses réductionnistes (études des composants du système), pour former la biologie systémique.

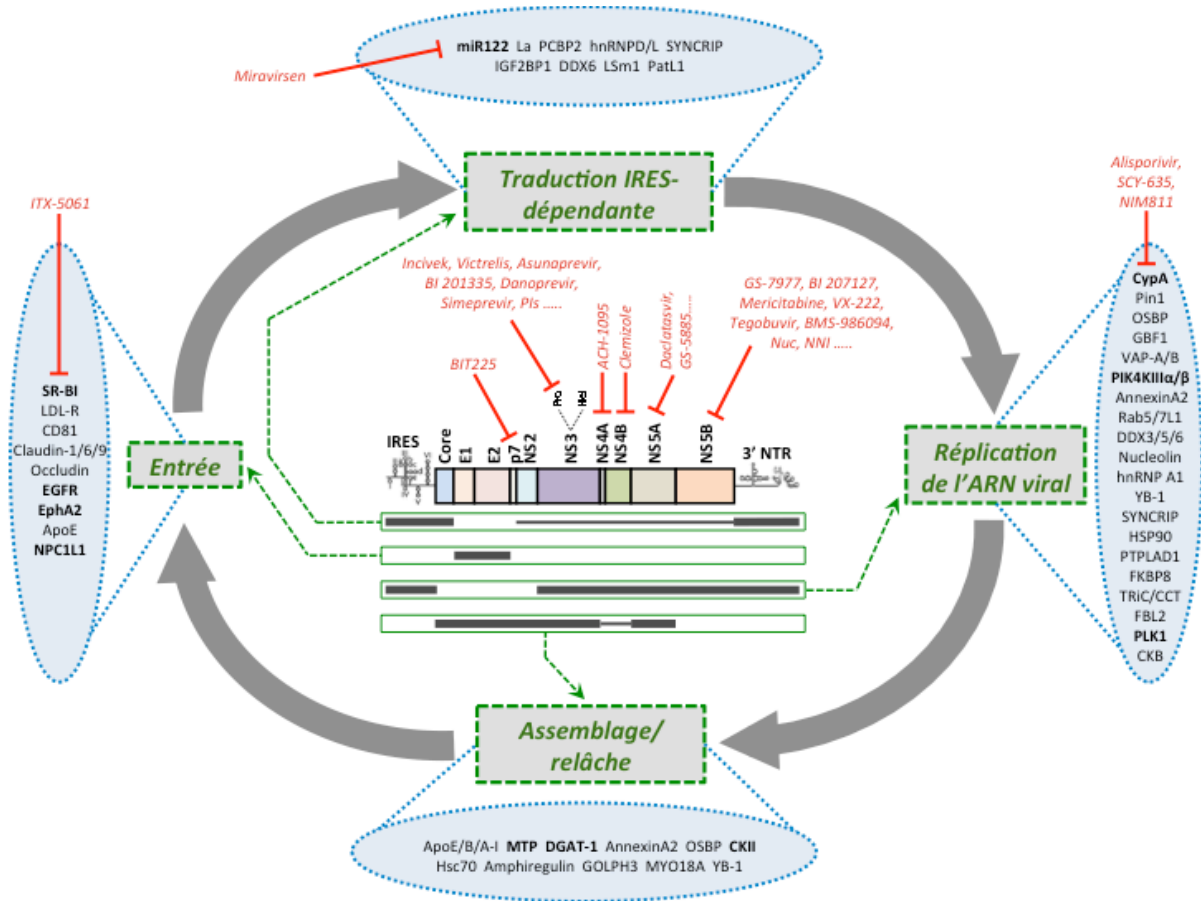
---

### 1.7.2 ÉTUDES DOUBLE HYBRIDE

Afin de révéler les interactions entre les protéines virales et les protéines de l'hôte, quelques équipes ont utilisé une approche de double hybride chez la levure (Y2H). On utilise une protéine virale couplée au domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription comme appât. La protéine 'proie', tirée d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc), est couplée au domaine d'activation du facteur de transcription et est co-exprimée dans une levure. Advenant une interaction entre les deux protéines, le facteur de transcription sera reconstitué et la production d'un gène de survie permettra la sélection de clones encodant un ADNc interagissant avec la protéine virale lors de culture en milieu sélectif.

L'étude de cette sorte la plus exhaustive chez le VHC fut réalisée en 2008 par l'équipe de Vincent Lotteau, et les données obtenues sont disponibles sur la base de données BIND. Chacune des protéines virales provenant d'un génotype 1b furent utilisées à tour de rôle. De cette étude, 314 interactions protéine-protéine ont été identifiées (de Chassey et al., 2008). En 2010, une autre équipe réalisa une étude en utilisant Core et NS4B en tant qu'appât, révélant 56 interactions (Tripathi et al., 2010). Cependant, aucun chevauchement des séries de données n'est observé, possiblement dû aux différences méthodologiques entre les études.

Plusieurs désavantages sont associés à cette méthode, dont un nombre élevé de faux positifs et de faux négatifs découlant du niveau d'expression nucléaire des protéines appât et proie, mais le plus grand désavantage découle de l'utilisation d'un système hétérologue, c'est-à-dire de la levure. De plus, l'utilisation de protéines tronquées est nécessaire pour permettre leur import vers le noyau et cela peut affecter le repliement de la protéine. Enfin, chacune des protéines du VHC est associée au ER et la technique Y2H n'est pas adaptée aux protéines membranaires dont le domaine transmembranaire doit être délété pour l'étude.



**Figure 1.9** Représentation du cycle viral, des facteurs de l'hôte importants et des inhibiteurs en développement

Au centre de la figure se trouve une schématisation du génome, annotée pour chaque protéine virale. Les inhibiteurs en phase clinique II, III ou IV, sont indiqués en rouge, rattachés à leur cible. Les bandes grises plus ou moins larges sous le génome indiquent une contribution majeure ou mineure, en fonction de l'épaisseur du trait, de la protéine au processus du cycle viral rattaché. Les protéines de l'hôte importante chaque l'étape du cycle viral sont énumérés dans les ovales. De plus, sont identifiés en caractères gras ceux pour lesquels une inhibition pharmacologique a été démontré comme affectant le VHC. (Adapté de(Chatel-Chaix et al., 2012))

---

### 1.7.3 ÉTUDES GÉNOMIQUES

Plusieurs études utilisant des banques ARNi à grande échelle ont été faites dans le but de trouver les gènes/voies de signalisation essentielles au cycle viral et d'en découvrir plus sur la biologie du VHC. Cette approche a permis d'identifier PI4KA, qui est retrouvée le plus souvent à travers les études, en tant que joueur important du cycle viral (Tai et al., 2009). Jusqu'à maintenant, deux criblages à l'échelle génomique ont été publiés, en plus de trois cribles de banques ciblées.

La toute première étude fut conduite par l'équipe de Charles M. Rice et ciblait spécifiquement 62 gènes de l'hôte connus comme interagissant avec une protéine virale ou encore appartenant à une voie cellulaire importante pour la réplication virale. Ces gènes furent testés sur un modèle répliatif complet de génotype 2a. Contrairement à l'hypothèse voulant que les processus de traitement des ARN double brin soient un processus de défense antiviral chez les mammifères, cette étude a démontrée que le silencage des composantes de cette voie, tel que Dicer, inhibent la réplication virale. (Randall et al., 2007). La deuxième étude portait sur 4000 gènes, pouvant potentiellement être une cible thérapeutique (*druggable*) sur le système réplicon sous-génomique 1b et identifia neuf cibles (Ng et al., 2007). La troisième portait sur une banque de 510 kinases et fut testée sur le système réplicon, mais n'identifia que 3 cibles (Supekova et al., 2008).

En 2009, deux études de criblage à l'échelle génomique furent publiées. La première identifia 96 gènes importants pour la réplication en utilisant un système sous-génomique réplicon 1b (Tai et al., 2009). La deuxième comportait un volet répliatif et un volet infectieux, et a été effectuée avec le modèle JFH-1 (génotype 2a). Cette étude a produit des comparaisons complètes avec les études d'interactions doubles hybrides et les études précédentes de criblage génomique sur le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), afin de voir si des gènes ont un effet panviral (Li et al., 2009).

Les résultats des études génomiques ne possèdent cependant qu'un faible taux de recoupement, qui peut être expliqué en partie par les différences méthodologiques, tel que

l'usage de banque de ARNi différentes ou de lignée cellulaire différentes, l'efficacité de silençage, le modèle de culture VHC, le génotype utilisé, la méthode de transfection du ARNi, et le seuil d'inhibition utilisé (niveau seuil déterminé pour qualifier une gène en tant que 'hit'). Ce type d'étude peut aussi mener à des faux-positifs (effet non-spécifique du ARNi) ou des faux-négatifs (mauvaise efficacité de transfection du ARNi ou piètre efficacité de silençage de celui-ci) qui ne permettent pas de définir le lien entre le gène et le virus. Il a donc un besoin d'études combinatoires, pouvant faire un lien direct entre un effet fonctionnel et une interaction protéique.



## 1.8 AVENUES THÉRAPEUTIQUES

La réplication du VHC se fait dans le cytoplasme (voir chapitre 1.6) et le matériel génétique viral ne s'intègre pas à l'ADN de l'hôte. Contrairement à certains autres virus comme le VIH, une éradication complète du virus de l'organisme hôte est donc possible et constitue la cible à atteindre dans le traitement des infections au VHC.

### 1.8.1 PREMIERS TRAITEMENTS

En 1991, le premier traitement à l'IFN de type I, élaboré par la compagnie Schering-Plough, reçut l'approbation de la FDA des États-Unis. En 1998, la même compagnie reçut la certification pour le traitement du VHC par une combinaison d'IFN- $\alpha$  et de ribavirine, développé au départ pour le traitement du VIH, mais inefficace pour ce dernier (Fried et al., 2002; Manns et al., 2001). Commercialisé sous le nom Rebetol, cet analogue de nucléotide a un effet antiviral à large spectre, inhibant la réplication de plusieurs virus de la famille des *Flaviviridae*. Il constitua un avancement majeur dans la prise en charge des patients infectés (Figure 1). Le traitement est cependant lourd, puisqu'il requiert 3 injections d'interféron par semaine car la molécule est éliminée par l'organisme en 12 à 24 heures (Vrolijk et al., 2004). Afin de remédier à la situation, la molécule d'IFN fut modifiée pour en augmenter la stabilité par l'attachement covalent de polyéthylène glycol (Bailon et al., 2001). Le traitement IFN- $\alpha$  pegylé (PEG-IFN $\alpha$ ) combiné à la ribavirine obtint l'approbation de la FDA en 2001 et constitua le standard de traitement (Standard of care, SOC) jusqu'en 2011. Ce traitement, qui s'étale sur un an, entraîne cependant de nombreux effets secondaires : fatigue, symptômes grippaux, anémie, symptômes gastro-intestinaux, anxiété et dépression. Ces effets poussent en moyenne de 10 à 14 % des participants à l'abandon du traitement (Fried, 2002).

Dans le traitement du VHC, la thérapie est considérée efficace lorsqu'on atteint la réponse virologique soutenue (RVS), c'est-à-dire que le virus est indétectable dans une période de 6 mois suivant la fin du traitement. La réponse au traitement PEG-IFN $\alpha$  combinée à la Ribavirine est extrêmement variable en fonction du génotype viral du patient. La RVS est atteinte pour 16 à 23 % des patients atteints du génotype 1 et ayant suivi un traitement de 24 semaines, alors que chez les patients génotype non-1, cette proportion augmente jusqu'à 69 % (McHutchison et al., 1998; Poynard et al., 1998; Reichard et al., 1998; Vrolijk et al., 2004).

Pour les patients où ce traitement échouait, aucune autre alternative n'était disponible jusqu'à récemment.

---

### 1.8.2 PREMIERS ANTIVIRAUX À ACTION DIRECTE

La preuve de concept de l'efficacité d'une petite molécule ciblant une protéine virale chez le patient VHC fut établie lors du premier essai clinique d'un antiviral à action directe (DAA) en 2003 (Lamarre et al., 2003). Le composé BILN2061 (ou Culpriver, Boehringer Ingelheim) cible l'activité protéase de la protéine virale NS3 (Chapitre 1.5.3.3) et bloque ainsi la réplication virale. Il a été démontré dans un modèle de chimpanzé que lorsque la molécule NS3 est mutée dans son site actif, l'infection par le virus est inefficace (Kolykhalov et al., 2000). De plus, des inhibiteurs de NS3/4A permettent de rétablir les mécanismes de défense de la cellule en empêchant le clivage de MAVS et TRIF (voir chapitre 1.6) (Dustin and Rice, 2007). NS3/4A est donc une cible attrayante dans le développement de médicaments puisqu'essentielle au cycle viral.

BILN2061, fut démontré comme ayant une activité antivirale importante dans le génotype 1, reconnu comme étant le plus difficile à traiter, en diminuant la charge virale de façon notable en deux jours. Cependant, les études cliniques furent arrêtées, due à une cardiotoxicité observée sporadiquement à forte dose chez le macaque rhésus (Hinrichsen et al., 2004). Le squelette macrocyclique de BILN 2061 fut exploité quelques années plus tard pour l'élaboration d'une nouvelle génération d'inhibiteurs de protéase.

Ce n'est qu'en 2011 que les deux premiers médicaments ciblant directement une protéine du VHC furent approuvés, tout d'abord aux États-Unis par la FDA, puis au Canada et en Europe (Sarrazin et al., 2012; Welsch et al., 2012). Il s'agit de la première génération de DAA commercialisés, et constituent encore à ce jour les deux seules molécules approuvées. Commercialisé par Vertex, le Telaprevir (Incivek®) fut le premier à recevoir l'approbation FDA, suivit de près par le Boceprevir (Victrelis®), fruit des recherches de Merck & Co. Une thérapie alternative était enfin disponible pour les patients n'ayant pas obtenue une RVS précédemment. En essai clinique, la RVS est améliorée de 40 à 70 % par l'ajout d'un de ces antiviraux au traitement PEG-INF $\alpha$ /ribavirin, en plus de permettre le raccourcissement du traitement dans certains cas. En revanche, en raison du haut taux de mutation du virus, décrite

dans la section 1.3.4, l'émergence de mutants résistants en monothérapie est très rapide et restreint l'utilisation seule de ces drogues. Donc, l'efficacité du traitement n'est pas pan-génotype, et ces molécules doivent être administrées en combinaison avec le PEG-IFN $\alpha$  plus ribavirine, alourdissant la charge d'effets secondaires. De plus, l'efficacité du traitement n'est pas pan-génotype. La course pour un traitement efficace, pan-génotype et ne requérant pas l'administration d'IFN $\alpha$  est donc toujours ouverte. Les industries mettent beaucoup d'effort dans l'élaboration de thérapies combinatoires, et cette avenue thérapeutique sera abordée dans la prochaine section.

---

### 1.8.3 AVENUES THÉRAPEUTIQUES FUTURES

Certains critères doivent être considérées avant le développement de nouvelles thérapies. Dans le meilleur des mondes, la thérapie devra :

- Être pan-génotypique
- Avoir une haute barrière à émergence de résistance
- Avoir peu d'effets secondaires
- Être facilement administré (oralement, avec un dosage simple)
- Ne pas nécessiter une combinaison avec de l'IFN $\alpha$

De nombreux essais cliniques de diverses compagnies pharmaceutiques sont en cours présentement. Ce résumé ne se veut pas une description exhaustive des études cliniques, étant donné leur nombre et leur roulement, mais plutôt un survol des avenues thérapeutiques présentement testées. Pour de plus amples informations sur les essais cliniques actuels, se référer à l'annexe 1 (Chatel-Chaix et al., 2012).

---

#### 1.8.3.1 THÉRAPIES COMBINATOIRES

Dans le traitement du VIH, la trithérapie HAART (Highly active anti-retroviral treatment) constitue le traitement standard car il permet d'augmenter la barrière de résistance et l'émergence de mutants de résistance. En effet, pour avoir un virus résistant à la thérapie, celui-ci doit pouvoir se répliquer et acquérir des mutations de résistance à toutes les drogues

utilisées. Après le succès dans la gestion du VIH par la tri-thérapie, l'industrie tente de suivre le même chemin pour le traitement des infections au VHC.

Tel qu'abordé dans la section traitant de la quasi-espèce du virus, la polymérase virale a un taux d'erreur très élevé, et un important nombre de virus sont produits en une journée. Statistiquement, pour une thérapie induisant une baisse considérable dans la production de virion après le premier jour de traitement, chaque position nucléotidique peut être mutée chaque jour. Pour avoir un double mutant de résistance, il faudrait qu'une mutation séquentielle ait lieu. La possibilité que cela se produise sans affecter la viabilité du virion est très faible (Bukh et al., 1995). Cette réalité démontre un réel besoin d'effectuer plus d'une sélection à la fois afin de parvenir à un traitement efficace. Un traitement combinatoire permettrait de réduire l'apparition de résistants (à condition que les patrons de résistance ne se recoupent pas), et de retirer l'IFN de la thérapie, ce qui réduirait grandement les effets secondaires. Plusieurs compagnies pharmaceutiques ont lancé des essais cliniques en combinant deux inhibiteurs. Ces combinaisons sont le thème principal de la revue de littérature disponible à l'annexe 1. Bref, la course est lancée pour avoir le premier traitement sans IFN sur le marché, puisqu'il y a un besoin médical à combler dans ce domaine.

---

### 1.8.3.2 ANTIVIRAUX À ACTION DIRECTE

Les protéines virales les plus ciblées pour le développement de médicaments sont NS5B, NS3/4A, et la phosphoprotéine NS5A, puisque celles-ci jouent un rôle central dans le cycle viral. La majorité des essais cliniques ciblent ces trois protéines virales.

#### 1.8.3.2.1 ANTIVIRAUX CIBLANT NS3/4A

---

La rôle central de NS3/4A, tel que décrit ci-haut, en fait une cible de choix. Suite au retrait de BILN2061 d'essais cliniques, des homologues de structures, tel que TMC 435 (Tibotec/Janssen) et le *danoprevir* (InterMune/Roche), ont été développés et testés en phase clinique. Le TMC 435 est présentement en phase III et a obtenu une approbation pour développement accéléré par la FDA à la suite des résultats de phase II, où les RVS étaient de 74 à 86 %. Le danoprevir est présentement en phase II pour le développement d'une thérapie sans IFN $\alpha$ . Boehringer Ingelheim teste présentement une molécule d'une nouvelle classe

d'inhibiteur de protéase (NS3) en phase III (BI 201335). Au total, on dénombre près d'une dizaine de molécules ciblant la protéase NS3 présentement à l'essai en phase I et II. Astex Pharmaceuticals a aussi développé une molécule suscitant beaucoup d'intérêt, puisqu'elle possède un mode d'action différent : la molécule se lie l'interface protéase/hélicase de NS3 et en stabilise ainsi la conformation inactive de la protéase (N. E. Wilsher, 2012).

#### 1.8.3.2.2 ANTIVIRAUX CIBLANT NS5A

---

Dès sa découverte, la molécule daclatasvir (BMS-790052, Bristol-Myers Squibb) démontra des résultats exceptionnels *in vivo* et des EC<sub>50</sub> de l'ordre du picomolaire *in vitro*, une première pour une drogue ciblant NS5A (Gao et al., 2010). Sans activité enzymatique connue, le rôle précis de NS5A est peu caractérisé, et il en est de même pour le mécanisme d'action de daclatasvir sur la réplication. Les études de génétique inverse, étudiant les mutants de résistances de la drogue, constituent l'évidence principale du mode d'action de la drogue sur NS5A. Six autres inhibiteurs de NS5A sont à l'essais en phase I, mais le daclatasvir est le plus avancé et présentement à l'étude en phase III. Cet inhibiteur est prometteur et pourra constituer une alternative pour les patients ayant développé des mutations de résistance aux inhibiteurs de NS3.

#### 1.8.3.2.3 ANTIVIRAUX CIBLANT LA POLYMÉRASE NS5B

---

Le site actif de la polymérase NS5B est très bien conservé à travers les génotypes, puisque l'apparition de mutation à l'intérieur de cette protéine entrainerait une perte d'efficacité substantielle dans la réplication virale. Des inhibiteurs ciblant NS5B auraient donc potentiellement un effet pan-génotype. On distingue deux groupes d'inhibiteurs dans cette catégorie : les inhibiteurs nucléosidiques (IN) qui agissent par compétition en liant le site actif de la polymérase et les inhibiteurs non-nucléosidiques (INN) qui se lient sur des sites allostériques. L'efficacité des INN est plus variable en fonction des génotypes, puisque les séquences des sites de liaisons sont moins conservées (Nyanguile et al., 2010).

Bien que plus d'une quinzaine de molécules soient testées en phase clinique, un IN développé par Gilead, GS-7977, se démarque et est maintenant en phase III de développement.

Les résultats sont plus qu'encourageants, puisque 100% des patients traités dans l'étude clinique ont atteint la RVS 4 semaines.

#### 1.8.3.2.4 ANTIVIRAUX CIBLANT UNE AUTRE PROTÉINE VIRALE

---

La viroporine p7 est essentielle à l'assemblage du virus, mais est difficile à cibler puisqu'elle possède une grande variabilité de séquence, rendant les drogues la visant génotype-dépendentes (Griffin et al., 2008). Le premier inhibiteur en phase clinique de cette catégorie, BIT225, développé par Biotron, est en phase II et démontre des résultats prometteurs.

Une autre molécule première de classe, Clemizole (Eiger BioPharmaceuticals), fut l'objet d'étude clinique phase I. Cette molécule inhibe la liaison entre NS4B et l'ARN, et inhibe ainsi la réplication de l'ARN viral (Einav et al., 2008). Aucune donnée n'est disponible pour l'instant quant à l'efficacité de cette drogue.

Dans le passé, plusieurs avenues ciblant l'entrée du virus dans la cellule hôte furent explorées, mais aucune ne s'avéra efficace. En effet, les anticorps neutralisants sont inefficaces puisque, d'une part, les protéines E1 et E2 à la surface du virus sont extrêmement variables et que, d'autre part, ces inhibiteurs n'empêchent pas la transmission entre les cellules par les jonctions serrées (Meunier et al., 2005; Scheel et al., 2008). D'autres avenues possibles d'inhibition virale restent encore inexploitées. Par exemple, l'assemblage du virus dans la cellule hôte, qui est dépendante de la multimérisation de Core, pourrait être ciblé, ainsi que la dimérisation des protéines virales essentielles au cycle viral.

---

#### 1.8.3.3 ANTIVIRAUX CIBLANT L'HÔTE

Sachant que le virus dépend totalement des interactions avec l'hôte afin de compléter son cycle viral, une alternative aux DAA est de cibler directement ces interactions spécifiques (HTA). De cette façon, la barrière à l'apparition de mutation de résistance est beaucoup plus élevée que les thérapies DAA et risque fort d'être pan-génotype. L'inhibition pourrait se faire de deux façons : en ciblant le mécanisme moléculaire de la protéine de l'hôte ou en ciblant l'interface de contact entre la protéine virale et la protéine de l'hôte. Cibler l'interface virus/hôte permettrait de réduire les possibilités d'effets secondaires, et constitue un avantage

considérable puisque le risque effets secondaires est le principal désavantage des HTA. Cette approche est utilisée dans le traitement du VIH par un agoniste de CCR5 (Wilkin and Gulick, 2012), faisant la preuve de concept de l'approche dans un contexte d'infection virale. En théorie, chacune des interactions virus-hôte peut constituer une cible potentielle. Il est donc essentiel de mieux comprendre ces interactions. Dans cette section, une revue non exhaustive de quelques thérapies prometteuses sera résumée.

#### 1.8.3.3.1 INHIBITEURS D'ENTRÉE

---

Tel que décrit dans la section 1.5.1, l'entrée du virus dans la cellule requiert l'attachement du virion à divers facteurs de l'hôte. SR-B1, joueur essentiel de l'attachement à la surface de la cellule ou aux jonctions serrées, peut être inhibé par ITX-5061 (iTherX), et son efficacité est présentement évaluée en phase IIa (Zhu et al., 2012).

La découverte récente de nouveaux facteurs d'entrée du virus conduit aussi à de nouvelles options thérapeutiques, puisque certains d'entre eux sont déjà la cible de petites molécules utilisées pour le traitement d'autres maladies (EGFR, NPC1L1 et EphA2, voir figure 1.6) (Chatel-Chaix et al., 2012). Il serait donc aisé de recycler ces molécules approuvées par la FDA pour les tester en phases cliniques.

#### 1.8.3.3.2 INHIBITEURS DE RÉPLICATION - CYCLOPHILINE

---

La cyclophiline A (peptidylprolyl isomerase A, CypA) stimule l'activité de liaison à l'ARN de NS5A et est essentielle dans la réplication de l'ARN viral (Foster et al., 2011). La compagnie Novartis a tenté de développer un inhibiteur de CypA, Alisporivir (Debio-025, Novartis), qui a démontré une efficacité pan-génomique, une grande barrière à l'apparition de résistance, et un taux de RVS de 80 % des patients de génotype 2 et 3 dans une étude clinique en bi-thérapie en combinaison avec la ribavirine (sans IFN) (Crabbe et al., 2009; Flisiak et al., 2012). Malheureusement, les essais cliniques ont été arrêtés aux États-Unis pour l'instant par la FDA suite au décès d'un patient d'une pancréatite. Quoiqu'il en soit, Novartis a su démontrer pour la première fois par son étude la faisabilité d'une approche ciblant l'hôte pour le traitement du VHC.

#### 1.8.3.3.3 INHIBITEURS DE RÉPLICATION - PI4KA

---

La découverte de ce facteur fut d'un intérêt particulier puisque son silençage a un effet remarquable sur la réplication virale (Berger et al., 2011). La kinase est recrutée à la toile membranaire créée par NS4B, où elle est activée par NS5A, pour créer un environnement enrichi en PI4P (Reiss et al., 2011). Les inhibiteurs de PI4KA, tel que PIK3 et AL-9, démontrent une inhibition de la réplication *in vivo*, non pas due à une délocalisation de PI4KA, mais bien par le blocage de son activité kinase (Bianco et al., 2012). Cependant, le modèle murin possédant une mutation dans le domaine kinase démontre un phénotype létal, démontrant un rôle essentiel de la protéine à l'échelle physiologique (Vaillancourt et al., 2012). Cette constatation pose un bémol sur la possibilité d'utiliser ces inhibiteurs comme traitement pour le VHC.

#### 1.8.3.3.4 INHIBITEURS CIBLANT L'ARN VIRAL

---

Tel que mentionné plus tôt, miR122 est indispensable à la traduction et la réplication de l'ARN viral, en se liant à la région non transcrite de l'ARN viral dans la région 5'UTR (Chang et al., 2008; Henke et al., 2008). Une approche originale, bloquant l'activité de miR122 en utilisant un oligonucléotide anti-sens verrouillé (Miravirsén), est présentement testé en phase clinique (Lanford et al., 2010). Cette approche comporte plusieurs avantages : comme les sites de liaison de miR122 sont conservés dans tous les génotypes (permettant une approche pan-génotype), il n'y a pas de développement de mutations de résistance et surtout, l'expression de miR122 est limitée au foie, réduisant ainsi la possibilité d'effets secondaires dans d'autres organes. De plus, ce traitement constitue une avancée médicale importante, puisqu'il s'agit de la première thérapie ciblant un micro-ARN, toutes maladies confondues.

#### 1.8.3.3.4 INHIBITEURS DE LA RELÂCHE

---

Tout comme le cas des nouveaux facteurs d'entrée, la possibilité de faire du 'recyclage de drogues' fut testée en phase clinique. Tel qu'expliqué à la section 1.5.2.3, la relâche du virus exploite la voie des VLDL (Huang et al., 2007). Un acteur important de cette voie est DGAT1, et son silençage mène à une diminution de la relâche de virus (Herker et al., 2010).



Novartis a testé la petite molécule LCQ-908 qui était déjà testé en phase clinique pour d'autres applications. Malheureusement, les essais furent interrompus, faute d'effet notable.

## 1.9 MODÈLES D'ÉTUDE

L'étude du VHC fut longtemps ralentie par le fait qu'aucun système d'étude permettant la reproduction du cycle viral complet n'était disponible avant 2005 (Wakita et al., 2005). Depuis 1999, les études biochimiques et cellulaires reposaient pour la plupart sur le système du réplicon sous-génomique, qui fut le premier modèle réplicatif (Lohmann et al., 1999). Un schéma des systèmes de réplicon, de pseudo-particules et du modèle infectieux est disponible à la Figure 1.10.

### 1.9.1 LE SYSTÈME DU RÉPLICON

Le réplicon bi-cistronique du VHC est constitué en 5' de l'IRES du virus qui permet la traduction d'un gène de résistance à la néomycine et/ou d'un gène rapporteur, suivi d'un deuxième IRES, souvent celui du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) qui permet la traduction des protéines non-structurales NS3 à NS5B, et finalement la région 3'UTR. Cette région, de NS3 à NS5B, constitue l'unité répllicative du virus, c'est-à-dire qu'elle est suffisante pour assurer la réplication de l'ARN à l'aide du 3' et 5' UTR à l'intérieur d'une cellule. Comme les protéines structurales ne sont pas présentes dans le système, il n'y a pas de production de particules virales (Lohmann et al., 1999). Les réplicons possédant le gène de sélection à la néomycine peuvent être maintenus dans les cellules hépatocytes Huh7 à l'aide de sélection au G418, ce qui permet d'étudier la réplication du virus dans des criblages chimiques ou ARNi à haut débit. Notre laboratoire utilise un réplicon de génotype 1b, qui est aussi le plus utilisé à travers le monde.

### 1.9.2 LES PSEUDO-PARTICULES

Les pseudo-particules du VHC (VHCpp) permettent l'étude de l'entrée et de la fusion des membranes. Elles sont constituées d'une enveloppe du VHC à la surface sur une particule rétrovirale du VIH. Elles contiennent aussi un gène rapporteur, tel que la luciférase, permettant l'étude du processus d'entrée et son inhibition par des anticorps neutralisant ou des petites molécules (Bartosch et al., 2003; Hsu et al., 2003). Ce système est peu répandu, mais permet l'étude de l'entrée chez des isolats dérivés de patients de tous génotypes (Pestka et al., 2007).

---

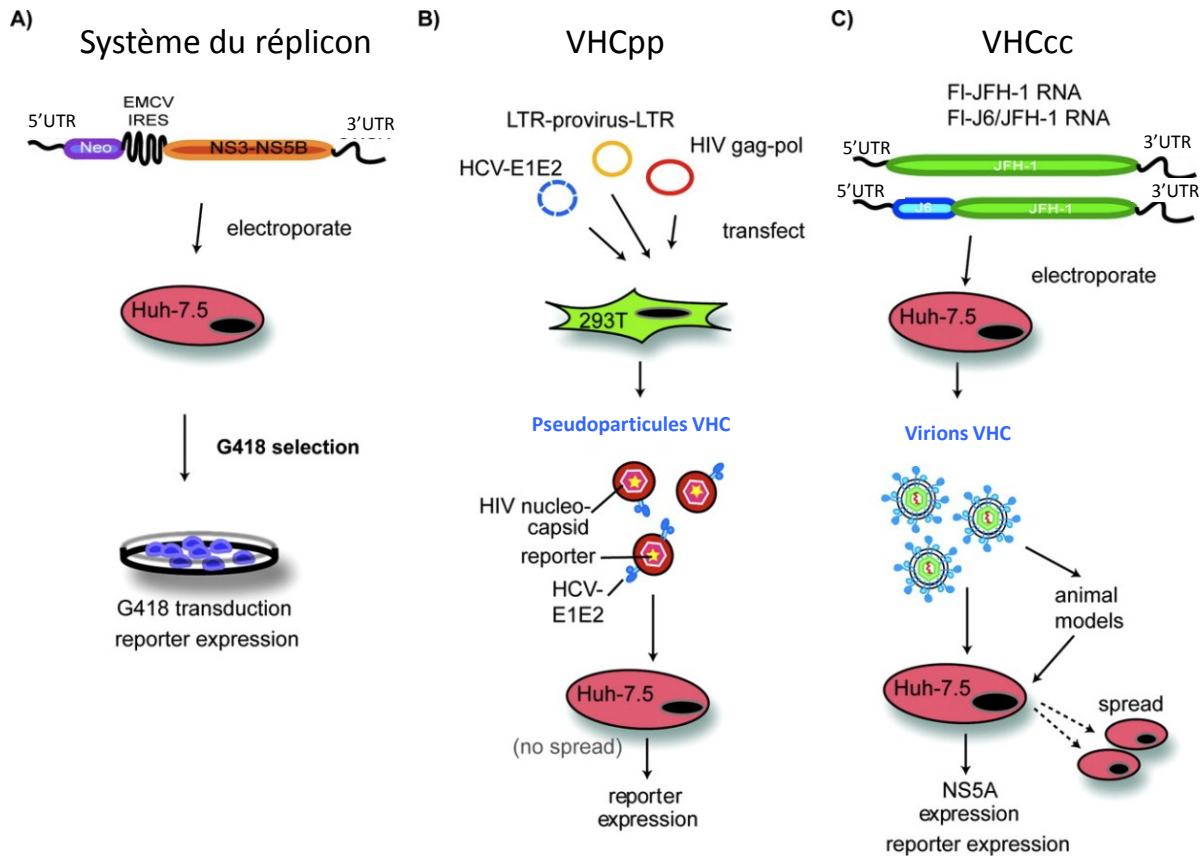
### 1.9.3 LES MODÈLES INFECTIEUX DE CULTURE CELLULAIRE

Un isolat obtenu d'un patient atteint d'une forme d'hépatite fulgurante et sévère (JFH-1) permet la production du premier modèle infectieux. L'électroporation de l'ARN de JFH-1 dans une lignée cellulaire Huh7.5 mène à la production du premier modèle infectieux (Wakita et al., 2005). Les virus produits dans ce système sont infectieux non seulement dans les lignées cellulaires, mais aussi chez le chimpanzé et la souris humanisée (Lindenbach et al., 2006). La réplication virale peut être mesurée par la production d'ARN viral dans la cellule infectée par qPCR ou encore *via* l'expression de gènes rapporteurs. Un modèle chimérique, J6/JFH1/Rluc2a, élaboré à partir du modèle précédent permet d'augmenter les titres de 100 à 1000 fois en culture, et l'ajout d'un gène rapporteur *renilla* luciférase facilite la détection *via* la production de luminescence proportionnellement à la réplication. (Jones et al., 2010; Lindenbach et al., 2006). Notre laboratoire utilise ce modèle, puisqu'il est compatible avec des criblages à haut débit. Une limitation de ce système est la nécessité d'utiliser des lignées permissives, tel que les Huh7.5, qui ne reflètent pas la physiologie cellulaire normale, en raison d'une mutation dans le gène codant pour RIG-I qui bloque la cascade de signalisation menant à la production d'IFN (Bartenschlager and Pietschmann, 2005).

---

### 1.9.4 LES MODÈLES DE SOURIS

Un modèle permettant la greffe d'hépatocytes humains dans des foies de souris a été développé en laboratoire. Les souris possèdent un activateur de l'urokinase plasminogène, ce qui mène à la destruction de leur foie. De plus, ces souris sont sévèrement immunosupprimées (lignée de souris uPA-SCID), ce qui permet le maintien d'hépatocytes humains dans le foie de la souris (Mercer et al., 2001). Les souris humanisées permettent l'étude de l'infection du VHC et l'évaluation de l'efficacité de drogues potentielles *in vivo*. La faible reproductibilité d'infection et un haut taux de mortalité en limite cependant l'utilisation. De plus, ce modèle ne permet pas l'étude de vaccins et de thérapies basées sur le système immunitaire ou la pathogénèse, puisque ces souris ne possèdent pas de système immunitaire (Bissig et al., 2010).



**Figure 1.10 Modèles d'étude pour le VHC**

Schémas des systèmes modèles pour la réplication, l'entrée et l'infectivité. (A) Le système de réplicon sous-génomique bi-cistronique contient l'unité répliquative du VHC, ainsi qu'un gène de sélection qui est parfois couplé à un gène rapporteur. L'ARN est électroporé dans les cellules permissives Huh7.5 et les colonies positives sont sélectionnées par le G418. (B) Les pseudo-particules du VHC permettent l'étude de l'entrée dans la cellule. Les rétrovirus recombinant sont générés dans les cellules 293T à partir de la polyprotéine gag-pol du VIH et des glycoprotéines de l'enveloppe du VHC (E1 et E2). Les particules peuvent ensuite être utilisées pour infecter une lignée permissive (Huh7.5) et l'efficacité d'entrée est mesurée à l'aide d'un gène rapporteur. (C) Sont représentés ici deux modèles de culture cellulaire du VHC infectieux (VHCcc). Le système JFH-1 (2a) et la chimère J6/JFH-1 (1b/2a) décrit ici sont aussi disponible en version bi-cistronique codant pour un gène rapporteur.

L'électroporation de l'ARN transcrit *in vitro* dans les cellules permissive Huh7.5 permet la production de particules virales. Ces virions peuvent ensuite être utilisés pour infecter des cellules naïves. L'infection peut être mesurée au niveau de l'ARN viral, de la production de protéines virales ou par la mesure du gène rapporteur. (Adapté de (Tellinghuisen et al., 2007))

## 1.10 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Il y a un besoin médical réel non comblé pour le traitement de l'hépatite C. Les traitements actuels ne permettent pas d'atteindre 100 % de RVS chez tous les génotypes et tous les patients. De plus, les effets secondaires du traitement sont lourds et il y a peu de ressources pour les patients chez qui il y a une apparition de mutants de résistance aux traitements actuels. Une approche ciblant l'hôte permettrait d'établir une barrière à la résistance beaucoup plus élevée que les thérapies DAA, et pourrait être pan-génotype. Quelques molécules en phase clinique ciblant l'hôte, tel que le miravirsén et l'alisporivir, font la preuve de concept de ce type de traitement.

Il est indispensable de parler des relations entre le virus et l'hôte lors de la description des protéines virales, du cycle cellulaire et des mécanismes de subversion de l'immunité, tel que décrits dans les sections précédentes. Les fonctions des protéines virales sont indissociables de leurs partenaires chez l'hôte. Il est donc essentiel de tenter de résoudre le réseau d'interactions virus-hôte afin de mieux comprendre la biologie moléculaire du VHC et de découvrir de nouvelles cibles antivirales.

La section 1.7 relate l'importance des interactions virus-hôte, et retrace les efforts précédents dans le but de résoudre l'infectome. Tel que mentionné, les études de double hybride ont mené à l'identification de plusieurs interactions potentielles, mais celles-ci n'ont pas été validées au niveau protéique ou fonctionnel, et cette approche n'est pas adaptée aux protéines membranaires telles que les protéines du VHC. D'autre part, les études de protéomique actuelles sont incomplètes et les études de génomique, qui donnent beaucoup d'informations sur les gènes ou les voies de signalisations importantes pour le virus, ne fournissent pas d'explications concrètes quant au lien entre les gènes et les protéines virales.

Dans ces circonstances, il est pertinent d'approfondir les connaissances dans le domaine de l'interactome du VHC. Cela permettra de mieux comprendre le virus et possiblement d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques à exploiter. Dans le cadre de ce projet, nous avons décidé de combiner une approche protéomique ainsi qu'une approche génomique, dans une optique d'étude systémique du virus. Cette approche de biologie des

systemes nous a permis d'identifier des cibles potentielles, et d'évaluer leur rôle dans la répllication virale.

**Chapitre 2**

**Manuscrit**

**Elucidating Novel Hepatitis C Virus/Host Interactions  
Using Mass Spectrometry and Functional Genomics  
Approaches**



## CHAPITRE II: ELUCIDATING NOVEL HEPATITIS C VIRUS/HOST INTERACTIONS USING COMBINED MASS SPECTROMETRY AND FUNCTIONAL GENOMICS APPROACHES.

Ce manuscrit est en préparation pour soumission au cours de l'année 2013. L'auteur a effectué les manipulations de laboratoire et produit toutes les figures de l'article, avec l'aide de E.B. pour les analyses de spectrométrie de masse et de la plate forme de criblage pour la production lentivirale et de l'infection des cellules lors du mini-criblage. Avec l'aide de L.C-C, l'auteur principal a contribué à l'élaboration des hypothèses et d'expériences, à l'analyse des résultats et la rédaction de l'article.

**Elucidating Novel Hepatitis C Virus/Host Interactions Using Combined Mass Spectrometry and Functional Genomics Approaches.**

Running title: Uncovering novel HCV interactors

Key words: Hepatitis C virus/Immunophilins/Interactome/Mass spectrometry/RNAi screen

Marie-Anne Germain <sup>1</sup>, Laurent Chatel-Chaix <sup>1</sup>, Eric Bonneil <sup>1</sup>, Pierre Thibault <sup>1,2</sup> and Daniel Lamarre <sup>1,3,4\*</sup>.

<sup>1</sup>Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC), <sup>2</sup>Département de Chimie, <sup>3</sup>Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, <sup>4</sup>Centre de Recherche du CHUM, Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada.

Abstract word count: 238 words

Text character count: 74 667 characters

\*Corresponding author:

Mailing address: Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC), Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montréal (Québec), H3C 3J7, CANADA

Phone: +1-514-343-7127

Fax: +1-514-343-7780

## **ABSTRACT**

More than 170 million people are infected with the hepatitis C virus (HCV) worldwide for which future therapies are expected to rely upon combination of oral antivirals. For a rapidly evolving virus like HCV, host-targeting antivirals are an attractive option. Thus to better understand HCV/host interactions, a system biology approach combining viral protein immunoprecipitation (IP) coupled to mass spectrometry identification (IP-MS/MS) and functional genomics screening were used to elucidate the role of novel HCV-host interactions. Here we reported the IP-MS/MS analysis for Core, NS2, NS3/4A, NS4B, NS5A and NS5B proteins that unveils a very stringent set of 98 specific HCV interactors including 24 previously characterized in protein-protein interactions. The identified human proteins shows enriched GO terms associated to endoplasmic reticulum, transport proteins with a major contribution of NS3/4A interactors, and transmembrane proteins for Core interactors. The host interactome produced from the interaction network of the 98 viral partners emphasizes a high degree distribution, a high betweenness distribution and a high interconnectivity of targeted human proteins in agreement with previous virus-host interactome studies. Similar centrality features are obtained by including literature data, and all together are consistent with the complete picture of HCV-host protein interactome. Gene silencing further reveals a strong enrichment of HCV partners as host factors with 35 proteins including 12 newly identified modulators of HCV RNA replication. The study provides highly stringent association between HCV interactors and their functional contribution to viral replication cycle and pathogenesis.

## INTRODUCTION

With almost 170 million people infected worldwide, Hepatitis C virus (HCV) is a leading cause of chronic hepatitis, liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. Major improvements in patient treatment were achieved by the approval of the first direct acting antivirals (DAAs) in 2011, namely Incivek (Vertex Pharmaceuticals) and Victrelis (Merck & Co) [2]. Nonetheless, these drugs, co-administrated with pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin, inflict a heavy burden in side effects and have relatively low effectiveness in IFN-experienced non-responder patients. Unlike chronic HIV infection, HCV does not integrate its genome into the host chromosomes and replicate in the cytoplasm of the cell. This suggests that eradicating HCV from all infected individuals is an achievable goal.

HCV is a *Hepacivirus* member of the *Flaviviridae* family. Following attachment to host factors at the surface of hepatocytes, hepatitis C virions are internalized in a clathrin-dependent manner [3]. Subsequently to membrane fusion, the 9,6 kb viral RNA genome is released into the cytoplasm and translated into a single 3,000 amino acid polyprotein precursor via an internal ribosome entry site (IRES) [4]. Host and viral peptidases cleave the polyprotein precursor to form 10 mature viral proteins: Core, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B. The non-structural (NS) proteins are important for the intracellular life cycle. Briefly, NS2 is a serine protease required for polyprotein cleavage at the NS2-NS3 junction. NS3 forms a complex with NS4A and this complex possesses two main enzymatic functions, an ATPase/helicase and serine protease. NS4B induces the formation of a HCV specific membrane structure, named the membranous web, which creates a micro-domain within the cell where viral replication occurs. NS5A is a phosphoprotein that contributes to membrane web by inducing double membrane vesicles (DMVs) and controls RNA replication [5]. Last but not least, the RNA-dependent RNA-polymerase NS5B produces a negative RNA strand-template for viral RNA (vRNA) replication, from which it produces the genomic strands. P7 forms an ion channel of the viporin family and is important for virion assembly, together with NS2, NS3 and NS5A. Together with host factors acquired during the release process, the mature virion is composed of the viral RNA (vRNA) and the structural proteins Core, E1 and E2 [6].

As an obligatory intracellular parasite, HCV relies on its host to complete its viral life cycle. Furthermore, HCV encodes for only 10 proteins, which emphasizes the dependence of viral replication steps on co-opted host factors. Probably the most characterized example of such indispensable interaction is the dependence of vRNA replication on phosphatidylinositol-4-kinase alpha (PI4KA) [7-11]. The enzymatic activity of PI4KA host factor is essential for viral replication through the enrichment of phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) in the membranous web. Cyclophilin A (CypA) interaction with NS5A is also necessary, and drugs targeting CypA are currently tested in clinical trial for HCV treatment [12-14]. The adaptor molecules TRIF and MAVS, involved in the TLR3 and RIG-I-like receptors (RLR) pathogen recognition signaling pathways respectively, are targeted by the NS3/4A protease for blocking IRF3-dependent expression of IFN $\beta$ 1 and IFN-mediated cellular antiviral response [15]. Thus HCV-host protein-protein interactions are essential to viral propagation and also to viral immune evasion mechanisms in order to establish a chronic infection.

Because HCV is thought to replicate and to mutate at a high rate, therapies directly targeting viral proteins (DAA) are subject to fast appearance of resistance mutation. Consequently, therapies targeting the host are an attractive alternative. Host-targeting antiviral-based (HTA) therapies possess a greater genetic barrier to resistance than direct virus targeting antiviral-based therapies. Hence, unraveling the host-virus interactome is essential for novel antiviral target identification and for a better understanding of the cellular and viral biology. The majority of the previous studies were done using a yeast-two-hybrid system [16, 17]. However, this system is not optimal for membrane-bound proteins like those of HCV. Genome-wide RNA interference (RNAi) studies also brought a load of valuable information on HCV biology, but these studies did not provide a link between viral protein and host gene products [7, 18-21].

In an effort to characterize virus-host interactions and to better understand HCV life cycle, a system biology approach combining viral protein immunoprecipitation (IP) coupled to mass spectrometry identification (IP-MS/MS) and functional genomics screening were used to elucidate the role of novel HCV-host interactions. From 426 host proteins detected in the IP-MS/MS analysis of Core, NS2, NS3/4A, NS4B, NS5A and NS5B, 98 statistically enriched and specific interactions were identified including 24 previously characterized protein-protein

interactions (PPI) (e.g. DDX3 with Core and NS5A with VAPA) [22, 23], thus validating the approach. The interacting proteins were further assessed by gene silencing in a lentiviral-based RNAi (shRNA) screening in relevant HCV cell models. The analysis identified 34 host factors in total modulating HCV RNA replication, and provided strong evidences for the identification of 12 previously uncharacterized host factors among our enriched set of HCV partners. Overall, the study identified novel HCV interactors with a high degree of stringency, and provides an important association between HCV interactors and their functional contribution to viral life cycle and pathogenesis.

## RESULTS

### *Identification of HCV-associated host proteins*

In an effort to decipher HCV-host interactome, we used an IP-MS/MS approach and ectopic expression of individually tagged HCV proteins. Briefly, HEK293 cells were transfected with vectors encoding the core, NS2, NS3/4A, NS4B, NS5A and NS5B viral proteins fused with 3xFLAG tag and the control empty 3xFLAG tag vector (**Figure 1A**). In order to respect membrane topology, all viral proteins were tagged at the C-terminal extremity except NS4B that was tagged at the N-terminus. Following protein expression, cellular lysates were subjected to immunoprecipitation using a resin coupled to anti-FLAG antibodies. As illustrated in a schematic representation of **Figure 1A**, viral protein-containing complexes were isolated following several washing steps and a basic elution procedure. The expression of viral tagged proteins was first confirmed in cell lysates using an anti-FLAG antibody at the expected molecular weight (**Figure 1B**). Following elution with ammonium hydroxide, proteins were subjected to silver staining (**Figure 1C**) to visualize the immunopurification of viral and host protein complexes. The silver staining analyses of the corresponding protein complexes showed that bands similar in size to Flag-Core, -NS2, -NS3, NS4B, NS5A and NS5B were efficiently purified as the predominant proteins. In addition, the silver staining analysis showed co-immunoprecipitated host partners for each protein and weak bands in the 3xFLAG-MCS control condition corresponding to non-specific binding material eluted from the resin.

Biological replicates of immunoprecipitated cell extracts were digested with trypsin and corresponding digests were subjected to the LC-MS/MS (LC set-up comprised a C-18 trap and an analytical column 100 mm x 150  $\mu$ m). Label-free quantitative proteomics was used to profile protein abundances across sample replicates and conditions. From three independent experiments, data were clustered to correlate the abundance of interacting proteins between immunoaffinity extracts. Triplicate LC-MS/MS analyses from all isolated protein complexes enabled the identification of 5587 peptides from 1254 proteins with a false discovery rate below 1%. For each immunoprecipitation, 90% of the identified peptides showed a fold-change below 3 when compared to the mock sample, and 10% of peptides with greater than a

3-fold change were used for identification of interactors. Overall, 426 proteins were detected with two peptides or more, and reproducibly in multiple immunoaffinity protein extracts. By determining the proportion of each host protein in every immunoprecipitation conditions, fold enrichment was calculated and its distribution used in a threshold for the stringent selection of the upper 5% enriched host proteins for each viral protein (**Figure S1**). A total of 98 proteins were identified that corresponded to those criteria (**Figure 2A and Table S1**).

The core protein interacts specifically with a unique set of 22 host proteins. The known interactors ATP-dependent RNA helicase DDX3 and chromosome 14 open reading frame 166 (C14orf166) [24] were enriched in the 3xFLAG-Core by more than 8-fold and 4-fold respectively, validating the approach for identification of HCV-associated host proteins. Interestingly, the 2 most enriched core-associated proteins are the previously reported nucleosome assembly protein 1-like 4 (NAP1L4) and NAP1L1 (27). Notably, the characterized core interactant Complement component 1 Q subcomponent-binding protein (C1QBP) [25, 26] was enriched by 2-fold in our study but fell under the upper 5% threshold (see **Table S1**). In the IP 3xFLAG-NS2 condition, 8 interactants were identified that include Hepatitis B virus X-interacting protein (HBXIP) as the most enriched host protein (for others see **Figure 2A and Table S1**). Most of the identified NS2 partners are novel beside the protein calnexin (CANX) characterized as a cell apoptosis inhibitor induced in HCV-positive hepatocellular carcinoma (HCC) [27]. The IP-NS3/4A showed the highest number of interacting partners on silver staining gel and was reflected by the MS/MS analysis with a total of 33 statistically enriched hits. The IP 3xFLAG-NS3/4A retrieved previously identified TAR DNA binding protein (TARDBP), tubulin and importin subunit beta-1 (KPNB1 or NTF97) [28, 29]. All other proteins, including the most enriched ataxin-10 (ATXN10) and trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 (GART), isoform 1 of voltage-dependent anion-selective channel protein 3 (VDAC3) and isoform 1 of exocyst complex component 7 (EXOC7) are newly identified HCV partners. NS4B fold enrichment Gaussian curve showed a shift to the left, corresponding to low level of co-immunoprecipitated proteins (**Figure S1**). Because of this irregular distribution, the threshold for hit selection was increased and consequently, the lysine deficient protein kinase 1 (WNK1) was identified with the high degree of stringency criteria. Noteworthy, three proteins having fold enrichment over 3 were



identified: Interleukin enhancer-binding factor 2 (ILF2 or NF45), Calumenin (CALU) and Fanconi anemia group I protein (FANCI) (**Figure 2A and Table S1**). Interestingly, ILF2 was recently reported as a core partner [24]. From the data with the IP-NS5A conditions, 8 characterized interacting proteins out of 17 were confirmed in our study including the proteins VAPB, VAPA, BIN1, FKBP8, MOBKL1A and HSPA5, SMYD3 and USP19 previously identified by Y2H and IP-MS/MS [16, 23, 30-36]. Novel NS5A partners included girdin (CCDC88A) and egl nine homolog 1 (EGLN1) as the most enriched proteins (**Figure 2 and Table S1**). For the NS5B, 15 proteins were immunoprecipitated that matched selection criteria including the most enriched partners heat shock protein 90kDa alpha class A member 1 (HSP90AA1) FK506-binding protein 5 (FKBP5), creatine kinase B-type (CKB) and the proteasome activator complex subunit 3 (PSME3). In this study, only the MORF4 family-associated protein 1 (MRFAP1) was enriched in two conditions simultaneously, which was immunoprecipitated with both NS2 and NS3/4A proteins. Many identified PPIs that fell under the threshold were only investigated in the gene silencing RNAi screen. Overall, this approach identified 99 PPIs (98 partners) with a high degree of stringency and 74 distinct novel HCV protein interactors.

### ***Validation of Selected Host Interactors of Viral Proteins***

In order to further validate the identification of specific PPIs by MS analysis, we used a competitive 3xFLAG peptide elution process to increase specificity of selected HCV-host PPIs. The eluant was then subjected to Western blot detection. This elution procedure could not be used in the MS/MS analysis as the large amount of 3xFLAG peptide interfered with peptide detection. **Figure 3** (left panel) shows similar levels of the selected human protein in cell extracts upon viral protein expression or the control FLAG-MCS. The anti-FLAG immunoblots further confirm the presence of viral FLAG-tagged HCV proteins in cell extracts as well as after immunopurification (right panel). In accordance with previous reports, DDX3 is specifically immunopurified with core protein and detected only in the IP-core condition (**Figure 3, right panel**) [22, 25, 26]. TARDBP, EXOC7 and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 (MTHFD1) were confirmed as specific NS3/4A interactors. TARDBP is the only NS3/4A partner previously retrieved in a MS/MS analysis by Lai et al., [28], although no validation was available for this interaction. Finally, EGLN1 was

confirmed as an NS5A interacting protein (known as FKBP8 binding partner [37]) while immunophilin FKBP5 and HSP90 were validated as NS5B binding partners. This extensive validation further strengthens the degree of confidence for identification of novel HCV-host PPIs in our IP-MS/MS analysis.

### ***Gene Ontology term enrichment and Comparison to PPI***

Enriched GO terms are used to reveal functional pathways, molecular process or cellular compartment enriched from a gene protein list. Each list of statistically enriched HCV-associated protein was submitted to a GO term analysis using DAVID internet resource (**Figure 4**) [38]. It is expected to result in GO-terms enrichments associated with viral protein function, but it might also reveal novel functions or pathways. The immunoprecipitated proteins with Core, NS2 and NS5B showed an enriched GO-term associated to endoplasmic reticulum (ER) category, which is consistent with a putative role in viral replication functions. Core interactors are highly enriched in transmembrane proteins. Although not statistically significant, 6/8 NS2 interactors are also transmembrane proteins. NS3/4A showed major enrichment of the ontology term associated to arrangement of macromolecules to form a complex and transport proteins, which suggest a central role in the organization of viral replication. Such analysis could not be performed with the small number of NS4B enriched proteins. Surprisingly, NS5B did not show any major enrichment in the GO terms with the 15 proteins used in the analysis. GO-term enrichment analysis allowed us to correlate HCV-associated proteins retrieved in our analysis to functional pathways, subcellular localization and protein functions. The majority of those interactors are novel, illustrating the necessity to diversify the technologies to provide a comprehensive protein interactome. Indeed, transmembrane proteins are often problematic and hardly detectable in the transcription based yeast two hybrid technology

### ***Effect of silencing enriched host genes of HCV interactors on viral replication***

We next determined if the host proteins are involved in vRNA replication by silencing their expression with a lentiviral-mediated gene knockdown approach. The targeted functional RNAi screen was extended to a total of 234 proteins. This included 60 proteins out of the 98 statistically enriched proteins in our analysis and 174 proteins specifically pulled down in the

different viral IP conditions but who fell under our stringent selection threshold (see **Table S2** for complete screening data and the extended gene list). Three functional assays were performed in knockdown cells transduced with short hairpin RNA (shRNA)-expressing lentivirus in a medium throughput screening mode. Huh7.5 cells stably expressing the bicistronic Con1b sub-genomic replicon reporter system (Huh7-Con1-FLuc) was first exploited to investigate the gene silencing effect on vRNA replication (**Figure 5A**). The subgenomic replicon contains the 5'UTR and 3'UTR of HCV RNA genome that are required for its replication, and expresses a firefly luciferase (FLuc) under the control of HCV IRES and the viral replicative unit (protein NS3 to NS5B of genotype 1b) under an EMCV IRES. In a second assay, knockdown cells were electroporated with the infectious HCV (J6/JFH-1/p7Rluc2a) that contains a full genome and carries out a complete virus life cycle (**Figure 5B**). This chimeric construct is composed of the HCV 5'UTR region extending to NS2 from a J6 sequence, genetically engineered to express renilla luciferase (Rluc), and the sequence from NS3 through the 3'UTR from the JFH-1 isolate (genotype 2a). The reporter protein is inserted between p7 and NS2 with a foot-and-mouth-disease virus peptide cleavage site resulting in a self cleavage from the polyprotein. As a third assay, an Alamar Blue counter screen assay was performed to measure the viability of cells after gene knockdown. In the screening, five shRNA per gene were tested individually in each assay and performed in triplicates per experiment for the 234 genes (**Table S2**). The average of three experiments was used to set a threshold. Overall biological replicates had a low standard deviation for the 3 assays (see Table S2). For quality purposes, the following controls were included in each plate in duplicate: protease inhibitor BILN 2061-treated cells, YB-1 knockdown cells (shRNA YB-1), non-target transduced cells (shRNA NT) and untransduced cells. We previously reported a significant inhibition effect on viral replication in YB1 knockdown cells [29]. Non-transduced controls are used to confirm the absence of effects solely by infection with lentivirus while shRNA NT transduced cells are used to standardize results and arbitrarily set to one.

We found that gene silencing of all potential interactors did not have a significant positive effect on viral RNA replication, and thus no antiviral restriction factors were identified using Huh7-derived permissive cells to HCV replication. **Figure 5** (panel C, TmeV representation) further illustrated the 27 gene hits that inhibit viral replication with no significant effect of cell

viability based on an average of three independent gene silencing experiments. The threshold criteria for selection of gene hits were: 50 % > FLuc activities in Huh7-Con1-FLuc assay for two or more shRNAs (or one shRNA 30 % > HCV replicon FLuc activities), 75 % > J6/JFH-1/p7 Rluc 2a activities and 75 % < Alamar Blue viability assay. We observed a significant effect of knockdown genes identified as partners for each viral bait, and for genes previously described as hits in RNAi screening (**Figure 5**) [7-9]. In our study, all hits inhibiting J6/JFH-1/p7Rluc2a infection also affected viral replication in the HCV replicon assay.

In order to confirm the functional effects of gene hits in the RNAi silencing screen, shRNA of selected hits were produced at large scale to transduce HCV-containing replicon Huh7-Con1-FLuc cells and J6/JFH-1/p7RLuc2a-infected cells at a MOI of 10. Experiments were performed in quintuplicate and in parallel with the viability MTT assay. Similar controls to those in screening assays were included (shRNA targeting YB1, shRNA NT, and untransduced cells). Gene silencing was first demonstrated for the knockdown of the statistically enriched proteins EGLN1, TARDBP, HSD17B12 MTHFD1 and FKBP5 in 239T cells following three days of transduction including 2 days of puromycin selection pressure (**Figure 6A**). For both HCV reporter assays, the fold change in Fluc or Rluc activities for each gene knockdown was determined as a ratio of the shRNA NT, arbitrarily set to one. We observed significant effects on HCV replication upon silencing of those genes, which are not attributable to cell mortality as demonstrated by the lack of significant effect in the MTT assay conducted under similar cell conditions (**Figure 6B and 6C**). In these experiments, knockdown of the genes significantly reduced HCV replication in Huh7.5 cells infected with cell culture grown virus J6/JFH-1/p7Rluc2a (in contrast to HCV RNA-electroporated cells in screening assay) at 3 days post-infection. This infection model brings additional validation for the involvement of host proteins in the viral life cycle, and confirmed the functional screening. Finally, WNK1 (**Figure S3**) genes was not included in the shRNA screen, but when tested in similar gene silencing conditions shows a major decrease in HCV RNA replication.

Among the statistically enriched human interactors of HCV, 60 genes were silenced in this study (as available in our shRNAs collection) and 14 are found to be host factors (Core: C1QBP HSD17B12; NS3/4A: COPB1 EXO7 KPNB1 RAN TARDBP TNPO1; NS4B: WNK1; NS5A: BIN1 CAPZA1 EGLN1 SMYD3; NS5B: FKBP5, validation rate of 23.3%)

according to our stringent criteria (**Table S2**) and protein knockdown validation (**Figure 6A**). Interestingly, the validation rate of virus replication modulators identified from genome-wide siRNA screens are 0.45% [7] and 1.36% [21]. In addition, PTC1 identified as an enriched core partner in this study (but not tested in our RNAi screen) was previously reported by Li et al. [21]. Therefore, combining interactomic screens with genetic screens enhances the rate of functional validation, providing lists of cellular proteins enriched in modulators of viral replication. Overall, the RNAi screening and validation data provide association between host proteins pulled down with viral baits and functional contribution to viral life cycle.

### ***Interaction network and analysis***

In order to visualize the interactome on a broader level, we produced an interaction network using the 98 statistically enriched host proteins interacting with HCV proteins using Ingenuity Pathway Analysis software (**Figure 7**). Proteins were linked to their viral interactors manually, and connections between host proteins were generated by the software accordingly to the literature. Even though some hits did not produce secondary links, the majority of proteins (70%) could be linked. In agreement with observations from previous virus-host interactome studies, HCV proteins tend to interact with highly central proteins in the human interactome [16, 39]. Hub proteins were identified as proteins with at least 6 links within the interaction network, and 13 proteins were identified as such: DDX3 (Core interactant); KPNB1, VAPA, TUBB, TUBB4B, RAN and XPO1 (NS3/4A interactants); USP19, HSPA5 and HSPA9 (NS5A interactants), HSP90AA1, HSP90AB1 and MYBBP1A (NS5B interactants). This suggests that HCV proteins preferentially target pleiotropic cellular proteins. Not surprisingly, when looking at the functional screen results of those hub proteins, those who were tested in the screen had at least a minimal effect (25% inhibition) on vRNA replication on one or more system model (MYBBP1A, HSPA9, HSPA5 and TUBB4B were not tested in the screen since they were not available in the shRNA bank). Overall, our data are consistent with the complete picture of HCV-host protein interactome.

## DISCUSSION

The objective of this study was to identify novel viral-host protein interactions and to evaluate their role in the viral RNA replication process. To achieve our goal, we used an IP-MS/MS proteomic approach and a functional RNAi screening of genes encoding newly identified interacting proteins in sub-genomic HCV replicon-containing cells and J6/JFH-1-infected cells. We identified 74 unpreviously described HCV partners and 24 reported in previous PPIs studies using very stringent selection criteria. The overlap between the list of interactors described in this study and previous reports obtained with large-scale Y2H or proteomics studies and from literature is significant with an overall 24.5 % of shared host interactors (24/98), demonstrating the reliability and robustness of our screening approach. It also indicates that the interactome dataset is now close to completion. Indeed, there is an important overlap between our data and previously reported MS/MS analysis of Core and NS5A from Pichlmair et al [30]. Three hits with Core (DDX3, NAP1L1, NAP1L4) and 8 hits with NS5A were also recovered in our study (USP19, HSPA5, SMYD3, BIN1, VAPA, MOBKL1A, VAPB, FKBP8). The same study also demonstrated a role of the very stringent NS4B partner WNK1 identified in our study as a K7 interacting protein important for Vaccinia virus (VACV) replication. However, an increase in the growth of VACV is observed upon WNK1 silencing, which is in contrast to the inhibition of HCV replication. It is interesting to see that virus have evolved in different ways while exploiting the same cellular protein. Noteworthy, the poor number of interacting proteins retrieved in NS4B condition is consistent with what can be found in the literature [16]. Moreover, some proteins were found to be enriched in detergent resistant membranes proteomics studies (table S3) [40].

We further confirmed 15 host factors as modulators of HCV replication among our validated HCV partners (Core: C1QBP HSD17B12; NS3/4A: COPB1 EXO7 KPNB1 RAN TARDBP TNPO1 MTHFD1; NS4B: WNK1; NS5A: BIN1 CAPZA1 EGLN1 SMYD3; NS5B: FKBP5). The genome-wide RNAi screen in HCV replication by Tai et al. [7] unraveled a role of COP1 Coat complex in HCV replication. Authors reported that many coatomer subunits demonstrated substantial effect on vRNA replication, namely COPA, COPB1, COPB2, COPG and COPZ1. In our study, proteomics data shows an interaction between COPB1 and NS3/4A (with a 8 fold enrichment), and to a lesser extend with COPA (1,7 fold enrichment; COPA was

also present in NS5A condition; Table S1 and data not shown). Indeed, COPB1 tested in our screen had a substantial effect on HCV replication in both model systems used, which correlates with literature. It is interesting to note that many viral proteins interact with COPB1 including Nef HIV1 [41, 42], NS1 RSV [43], V Measle virus [44], NSs Bunyavirus La Crosse[30], BBRF2 and BNLF2a EBV [45], ST-Ag (SV40) and E5A HPV6b [45]. More generally, NS3/4A strongly interacts with the protein transport. To our knowledge, this is the first indication of a direct interaction between HCV NS3/4A and a COP protein.

It has long been known that TARDBP (TDP-43) modulates HIV expression [48]. TARDBP is an hnRNP protein, which can bind both DNA and RNA and is involved in RNA processing. Previous studies conducted in our lab (data not shown) demonstrate that TARDBP binds Y-box-binding protein-1 (YB-1), which is a host factor that is co-opted by the assembling capsids to regulate the equilibrium between viral RNA replication and virus production [29, 49]. Furthermore, knockdown of TARDBP shows major decrease in replication of the infectious HCV genome. Further investigation will be required to determine if this interaction between YB-1 and TARDBP cooperate to create a complex with NS3/4A.

Immunophilins, like cyclophilins, possess prolyl isomerase activity and are involved in protein folding. Previous reports revealed the importance of this family of proteins in HCV replication and cell survival with the involvement of FKBP8 [35, 36]. This interaction was also retrieved in our IP-NS5A conditions. Moreover, the FKBP8 interacting protein EGLN1 (PHD2, propyl-4-hydroxylase domain-containing (PHD) [37], an enzyme involved in the cellular response to hypoxia, was identified and validated as an NS5A partner and host factor for HCV RNA replication. Additionally, FKBP5 was retrieved in the IP-MS/MS analysis and confirmed as an NS5B partner and HCV cofactor. Likewise, HSP90AA1 and HSP90AB1 strongly interact with NS5B as reflected by the fold enrichment in our IP-MS/MS analysis and confirmed as an NS5B partner and HCV cofactor. However, their silencing individually did not affect HCV replication possibly due to some redundancy in protein interactions or insufficient protein silencing. Indeed, HSP90 was further reported to be part of a complex with NS5A and FKBP8 that has an important role in HCV RNA replication [35, 50]. It is thus tempting to speculate that these immunophilins provide a link between NS5A and NS5B within the HCV RNA replication machinery. Nevertheless, these data add strong evidences

that members of this protein family are highly important in viral replication and co-opted by HCV.

In conclusion, we have discovered 74 HCV partners and 24 previously described. Six novel virus-host PPIs were further confirmed by IP-Western blotting. The implication of 234 genes of HCV-associated proteins was investigated in the viral RNA life cycle of which 30 host cofactors and 15 among our validated HCV partners were identified as modulators of HCV replication. This study contributes to the HCV interactome with a robust identification of HCV partners and of a significant high number of host factors that may enhance the selection of novel therapeutic host targets with fewer side effects along with the knowledge of the human interactome.



## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Cell culture***

293T (human embryonic kidney), Huh7.5 (human hepatoma derived) and Con1b (human hepatoma containing sub-genomic replicon) cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Wisent), supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin, 2 mM glutamine (all from Wisent) and 1% nonessential amino acids (Invitrogen) at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Huh7.5 cells harboring Con1b replicon were submitted to a 500 µg/ml G418 selection pressure to maintain HCV replication during culturing but not during screening. For screening, Con1b/Huh7.5 cells were seeded at a concentration of 5 000 cells per 96-well plate in white plate for replication assay and black plate for Alamar blue assay. For lentivirus production, cells were seeded at 3,000,000 cells per 100mm dishes. Transfections (IP or lentiviral production) were performed with linear 25 kDa polyethylenimine (PEI) (Polysciences, Inc) at 3 µg PEI to 1 µg DNA ratio.

### ***Plasmids and reagents***

3xFLAG cassette was inserted using AflIII/AgeI enzymes into pcDNA3.1 expression vector. This vector was used to clone NS2 (from JFH-1), NS3/4A (AB12) and NS5A (AB12). Core (JFH-1), NS4B (AB12) and NS5B (AB12) were cloned by inserting 3xFLAG cassette into pcDNA3.1 vector containing the viral protein.

FLAG and MTHFD1 antibody were purchased from Sigma (cat no F3165 and HPA001290) FKBP5 and EXOC7 from Santa Cruz (cat no sc-13983 and sc-365825), EGLN1 and DDX3 from Cedarlane (cat no ab4561 and A-300-474A), HSP90 from Cell Signaling (cat no 4874) and HSD17B12 from NovusBiologicals (Cat no NBPI-81567). TARDBP antibody was a kind gift from Dr. Christine Vande Velde.

### ***Lentiviral shRNA library production***

From MISSION TRC lentiviral library (Sigma-Aldrich), 234 MS hits were selected and shRNA were produced as follows. 5 clones per gene were produced individually in HEK293 cells (2x10<sup>4</sup>) plated one day prior to transfection. Transfections were performed using a

Biomek FX (Beckman Coulter) enclosed in a class II cabinet according to MISSION® Lentiviral Packaging Mix protocol (SHP001). Viruses were collected at 24 and 48h post transfection and were pooled prior to freezing. NT shRNA controls and 4% of random samples of each plate were used to measure lentiviral titers for quality control purposes. Titers were determined by limiting dilution assays using HeLa cells. Briefly, samples were diluted in complete DMEM (1:400 or 1:10,000) and added to HeLa cells. Media was changed at day 3 and 5 with complete DMEM containing 1 µg/µl puromycin (Wisent). After four days of selections, cells were stained with 1.25% crystal violet and plaque-forming units (PFU) were counted to determine viral titer.

### ***Large-scale shRNA production***

293T cells were transfected with pRSV-REV, pMDLg/pRRE, pMD2-VSVG, and various short hairpin RNA (shRNA)-expressing pLKO.1-puro constructs (Sigma-Aldrich) using linear 25 kDa polyethylenimine (PEI) (Polysciences, Inc) at 3 µg PEI to 1 µg DNA ratio. 48h after transfection, cell media was collected, filtered (0.45 µm filter), and aliquoted. MOI were determined using limiting dilution assays as described in previous section. shRNA Infections were conducted overnight in media containing 8 µg/ml Polybrene. For western blot analysis, puromycin was added to the medium at a concentration of 3 µg/ml to select lentivirus-infected cells.

### ***shRNA screening***

5000 cells per well were seeded in 96 well plates in 90 µl of completed DMEM containing 4 µg/ml polybrene. After plating, infection with lentivirus containing-shRNA at a multiplicity of infection (MOI) of 10 were performed using a Biomek FX (Beckman Coulter) in a class II cabinet. Readout was measured after 3 days. For sub-genomic replicon assay, cells were lysate and fluorescence (Fluc) was read using a buffer consisting of 100mM Trizma acetate, 20 mM Mg acetate, 2 mM EGTA 3,6 mM ATP, 1% Brij 58, 0,7% β-mercaptoethanol and 45 µg/ml luciferine pH 7.9. For alamar blue assays, cells were culture in black 96-well plates. 10 µL AlamarBlue reagent (Invitrogen; diluted 1:4 in PBS) were added to the cells and incubated for 1h at 37°C prior to fluorescence measurement using an EnVision plate reader (Perkin-Elmer) at 595 nm (excitation wavelength=531nm). A control plate with media and AlamarBlue only

251 (no cells) was used to determine the background that was subtracted to the fluorescence value. For Renilla luciferase assays, 50  $\mu$ L PBS and 50  $\mu$ L of 2mM EDTA 237 (pH8)/5  $\mu$ M coelenterazin (Nanolight) were added to the washed cells. As control, MISSION® shRNA NT, shRNA YB-1 (TRCN0000007952), shRNA DDX3 (TRCN0000000003) and BILN2061 0,1  $\mu$ g/ml were included in each plate, and values were normalized with shRNA NT. Fluc and Rluc activities were measured using a MicroBeta JET luminescence counter (PerkingElmer).

### ***Immunoprecipitation***

Transfected cells were washed twice with PBS, and lysed in 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.6 with protease inhibitor mix (Roche). Resulting cell extract were adjusted to 1  $\mu$ g/ml and subjected to immunoprecipitation as follows: pre-clearing of the lysates was done by incubating lysates with a 50:50 slurry of protein G-Sepharose (Sigma-Aldrich) prepared in the lysis buffer IgG beads for 1-2 hours. Supernatants were then immunoprecipitated by adding 40  $\mu$ l of anti-Flag affinity gel (Sigma-Aldrich) prepared in TBS buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) as described by the manufacturer. Immunoprecipitates were then washed three times in lysis buffer and further washed three times with TBS. For MS/MS samples preparation, immune complexes were eluted from the resin using 100  $\mu$ l  $\text{NH}_4\text{OH}$  basic elution for 45 minutes, and dried using a SpeedVac. For western-blot analysis, elution was performed using the 3xFLAG purified peptide for 45 minutes at 4°C (Sigma-Aldrich) at a concentration of 250 ng/ $\mu$ l.

### ***Liquid chromatography mass spectrometry analysis***

Samples were resuspended in 50  $\mu$ l of 50 mM ammonium bicarbonate. TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) was added to the protein samples to reach the concentration of 5mM. Samples were incubated at 37 °C at 650 rpm for 30 min. 30  $\mu$ l of chloroacetamide at 55 mM was added and the samples were incubated at 37 °C at 650 rpm for 30 min. 1 $\mu$ g of trypsin was added and the samples were digested overnight at 37 °C. The samples were dried down in a Speed-Vac and resolubilized in 50  $\mu$ l of ACN 5% /formic acid (FA) 0.2%. 20  $\mu$ l of each samples were injected on a C18 precolumn (0.3 mm i.d. x 5 mm) and peptides were separated on a C18 analytical column (150  $\mu$ m i.d. x 100 mm) using an Eksigent nanoLC-2D system. A

56-min gradient from (A/B) 10–60% (A: formic acid 0.2 %, B: acetonitrile/0.2% formic acid) was used to elute peptides with a flow rate set at 600 nanoliter/min.

The LC system was coupled to a LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher). Each full MS spectrum was followed by six MS/MS spectra (seven scan events), where the six most abundant multiply charged ions were selected for MS/MS sequencing. Tandem MS experiments were performed using collision-induced dissociation in the linear ion trap. The data were processed using the Mascot 2.2 (Matrix Science) search engine. The database used was IPI human (182394 sequences).

The comparison of peptide abundances across different experimental paradigms was achieved using label free quantitative proteomics. Briefly, raw data files (.raw) from the Xcalibur software were converted into peptide map files representing all ions according to their corresponding m/z values, retention time, intensity, and charge state. Intensity values above a threshold of typically 10 000 counts were considered for further analysis. Peptide abundances were assessed using the peak top intensity values. Clustering of peptide maps across different sample sets were performed on peptides associated to a Mascot entry using hierarchical clustering with tolerances of 15 ppm and 1min for peptide mass and retention time, respectively. Normalization of retention time is then performed on the initial peptide cluster list using a dynamic and nonlinear correction that confines the retention time distribution to less than 0.1 min (<0.3% RSD) on average.

To compute the fold change of a protein, we use the variation of intensities between conditions. But giving an intensity count to proteins is irrelevant. Instead, we assign a number between 0 and 1 that describe the amount of representation of the protein within the different conditions. To compute protein's relative intensities, our software ProteoProfile (<http://www.thibault.irc.ca/proteoprofile/files/TechnicalGuide.pdf>) assigns weights to the peptides composing the protein. Each peptide has a weight that is used to represent its potential to describe correctly the protein. Each peptide starts with a weight in proportion to its own intensity level (Log 10 of the average intensity of the peptide divided by 10). Based on the Weiszfeld's iteratively re-weighted least squares algorithm, this weight is multiplied by the closeness of the peptide to the protein's fold change, through a series of iterations.

For analysis, when no peptide was detected in a condition, baseline threshold was attributed. Fold enrichment was calculated as follows: proportion of presence in sample x/average proportion in other samples.

### ***GO term enrichment analysis***

98 Hits retrieved from MS were submitted to Gene Ontology (GO) analysis, and one analysis was performed for each viral protein-hit list. IPI numbers were used in DAVID website to generate GO term list. The p-value was used to represent data. This value represent the probability of identifying number of genes corresponding to the GO-term out of the total number of gene corresponding to that term, in comparison of what would be expected out of random.  $-\log_2$  p-value are represented in graph for simpler representation.

### ***HCV production and infection assay***

J6/JFH-1/p7Rluc2a RNA was produced from lineated Xba1 DNA template (a kind gift from Charles Rice). Following phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation, RNA was generated using the MEGAscript T7 in vitro transcription kit (Ambion) according to the manufacturer's instruction and purified on RNesay Mini kit column purification kit (Qiagen) using the RNA cleanup protocol. RNA electroporation was conducted in cytomix buffer with Huh7.5 cells resuspended at a concentration of  $1.7 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup> as previously described by Kato et al [40]. Cells were plated in 150 mm cell culture dish with complete media and media was changed 24 h post-electroporation. 72-hours post-electroporation, cells were trypsinized and re-plated in 5 dishes of 150 mm. Virus containing supernatant was collected four days latter and cleared through a 0.45  $\mu$ M filter and stored at -80 °C. For infection assays, Huh7.5 cells were seeded at 4,000 cells per well in a 96-well white plate, and infected with shRNA at MOI 10. After 24 hours, supernatant was replaced with 75  $\mu$ l of J6/JFH1/p7Rluc2a culture supernatant, and media was replaced by fresh complete media after 7-8 hours. Replication was measured 3 days after J6/JFH1/p7Rluc2a as follows: cells media was removed and replaced with 50  $\mu$ l/well PBS. Then 50  $\mu$ l of 2mM EDTA (pH8)/5  $\mu$ M coelenterazin (Nanolight) was added and luciferase readout was measured. J6/JFH-1/p7Rluc2a screen were performed on electroporated cells: 2 days after electroporation, cells were seeded on white plates at a concentration of 4000 cells per well in media+polybrene. 3 days after shRNA infection,

replication was measured. Fluc and Rluc activities were measured using a MicroBeta JET luminescence counter (PerkingElmer).

### ***MTT assays***

Huh7.5 cells were cultured in transparent 96-well plates. 20  $\mu$ l of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] stock solution (5 mg/ml in PBS) was added to the cells and incubated for 1h at 37°C. After complete removal of the medium, cells were incubated at room temperature under mild shaking for 10 minutes with 150  $\mu$ l of DMSO containing 2 mM glycine pH 11 to dissolve crystals. Absorbance was read at 570 nm.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Christine Vande Velde who provided the anti-TARDBP antibody, Takaji Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo), Charles Rice (Rockefeller University) and Apath LCC for the use of JFH-1, for Huh7.5 cells and J6-JFH1(p7-Rluc2a) reporter virus, Ralf Bartenschlager (University of Hiedelberg) for luciferase-encoding Con1b subgenomic replicon and Didier Trono (École Polytechnique Fédérale de Lausanne) for the lentiviral packaging plasmids. We also acknowledge IRIC'S High Throughput Screening Core Facility, Jean Duchaine, Julie Lafontaine and Karine Audette for lentivirus production and transduction during the RNAi screen and IRIC's Genomics Core Facility, Raphaëlle Lambert, Caroline Paradis, Marianne Arteau for sequencing. This work was supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research attributed to D.L and L.C.C. and by the Novartis/Canadian Liver Foundation Hepatology research Chair to D.L.

## **AUTHORS CONTRIBUTION**

D.L. and L.C-C. designed the experiments, M-A.G. performed the experiments and wrote the manuscript, E.B. performed MS/MS analysis, L.C-C and M-A.G conjointly analyzed data, D.L., P.T., and L.C-C reviewed the manuscript.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V and Lai CL (2003) Viral hepatitis C. *Lancet* 362:2095-100.
2. Welsch C, Jesudian A, Zeuzem S and Jacobson I (2012) New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut* 61 Suppl 1:i36-46. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302144
3. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C and Rouille Y (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80:6964-72. doi: 10.1128/JVI.00024-06
4. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M and Nomoto A (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66:1476-83.
5. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, Santarella-Mellwig R, Habermann A, Hoppe S, Kallis S, Walther P, Antony C, Krijnse-Locker J and Bartenschlager R (2012) Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* 8:e1003056. doi: 10.1371/journal.ppat.1003056
6. Moradpour D, Penin F and Rice CM (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5:453-63. doi: 10.1038/nrmicro1645
7. Tai AW, Benita Y, Peng LF, Kim SS, Sakamoto N, Xavier RJ and Chung RT (2009) A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* 5:298-307. doi: 10.1016/j.chom.2009.02.001
8. Vaillancourt FH, Pilote L, Cartier M, Lippens J, Liuzzi M, Bethell RC, Cordingley MG and Kukulj G (2009) Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* 387:5-10. doi: 10.1016/j.virol.2009.02.039
9. Borawski J, Troke P, Puyang X, Gibaja V, Zhao S, Mickanin C, Leighton-Davies J, Wilson CJ, Myer V, Cornellataracido I, Baryza J, Tallarico J, Joberty G, Bantscheff M, Schirle M, Bouwmeester T, Mathy JE, Lin K, Compton T, Labow M, Wiedmann B and Gaither LA (2009) Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *J Virol* 83:10058-74. doi: 10.1128/JVI.02418-08
10. Berger KL, Kelly SM, Jordan TX, Tartell MA and Randall G (2011) Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication. *J Virol* 85:8870-83. doi: 10.1128/JVI.00059-11



11. Bianco A, Reghellin V, Donnici L, Fenu S, Alvarez R, Baruffa C, Peri F, Pagani M, Abrignani S, Neddermann P and De Francesco R (2012) Metabolism of phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha-dependent PI4P is subverted by HCV and is targeted by a 4-anilino quinazoline with antiviral activity. *PLoS Pathog* 8:e1002576. doi: 10.1371/journal.ppat.1002576
12. Yang F, Robotham JM, Nelson HB, Irsigler A, Kenworthy R and Tang H (2008) Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J Virol* 82:5269-78. doi: 10.1128/JVI.02614-07
13. Coelmont L, Hanouille X, Chatterji U, Berger C, Snoeck J, Bobardt M, Lim P, Vliegen I, Paeshuyse J, Vuagniaux G, Vandamme AM, Bartenschlager R, Gallay P, Lippens G and Neyts J (2010) DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS One* 5:e13687. doi: 10.1371/journal.pone.0013687
14. Flisiak R, Feinman SV, Jablkowski M, Horban A, Kryczka W, Pawlowska M, Heathcote JE, Mazzella G, Vandelli C, Nicolas-Metral V, Groscurin P, Liz JS, Scalfaro P, Porchet H and Crabbe R (2009) The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naive hepatitis C patients. *Hepatology* 49:1460-8. doi: 10.1002/hep.22835
15. Liang Y, Ishida H, Lenz O, Lin TI, Nyanguile O, Simmen K, Pyles RB, Bourne N, Yi M, Li K and Lemon SM (2008) Antiviral suppression vs restoration of RIG-I signaling by hepatitis C protease and polymerase inhibitors. *Gastroenterology* 135:1710-1718 e2. doi: 10.1053/j.gastro.2008.07.023
16. de Chasse B, Navratil V, Tafforeau L, Hiet MS, Aublin-Gex A, Agaogue S, Meiffren G, Pradezynski F, Faria BF, Chantier T, Le Breton M, Pellet J, Davoust N, Mangeot PE, Chaboud A, Penin F, Jacob Y, Vidalain PO, Vidal M, Andre P, Rabourdin-Combe C and Lotteau V (2008) Hepatitis C virus infection protein network. *Mol Syst Biol* 4:230. doi: 10.1038/msb.2008.66
17. Tripathi LP, Kataoka C, Taguwa S, Moriishi K, Mori Y, Matsuura Y and Mizuguchi K (2010) Network based analysis of hepatitis C virus core and NS4B protein interactions. *Mol Biosyst* 6:2539-53. doi: 10.1039/c0mb00103a
18. Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, Landthaler M, Landgraf P, Kan S, Lindenbach BD, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Brownstein MJ, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T and Rice CM (2007) Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12884-9. doi: 10.1073/pnas.0704894104

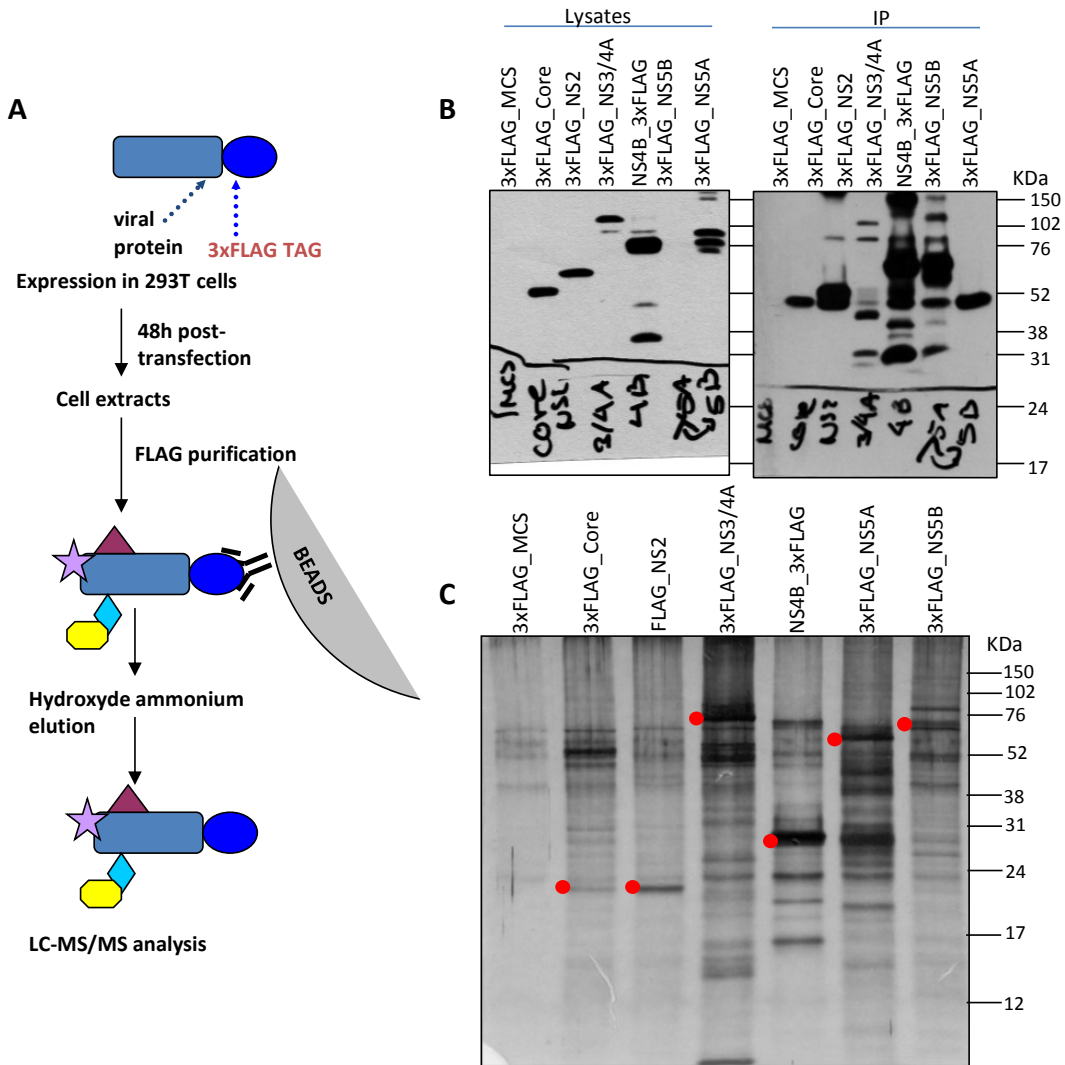
19. Ng TI, Mo H, Pilot-Matias T, He Y, Koev G, Krishnan P, Mondal R, Pithawalla R, He W, Dekhtyar T, Packer J, Schurdak M and Molla A (2007) Identification of host genes involved in hepatitis C virus replication by small interfering RNA technology. *Hepatology* 45:1413-21. doi: 10.1002/hep.21608
20. Supekova L, Supek F, Lee J, Chen S, Gray N, Pezacki JP, Schlapbach A and Schultz PG (2008) Identification of human kinases involved in hepatitis C virus replication by small interference RNA library screening. *J Biol Chem* 283:29-36. doi: 10.1074/jbc.M703988200
21. Li Q, Brass AL, Ng A, Hu Z, Xavier RJ, Liang TJ and Elledge SJ (2009) A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16410-5. doi: 10.1073/pnas.0907439106
22. Owsianka AM and Patel AH (1999) Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3. *Virology* 257:330-40. doi: 10.1006/viro.1999.9659
23. Tu H, Gao L, Shi ST, Taylor DR, Yang T, Mircheff AK, Wen Y, Gorbalenya AE, Hwang SB and Lai MM (1999) Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 263:30-41. doi: 10.1006/viro.1999.9893
24. Lee JW, Liao PC, Young KC, Chang CL, Chen SS, Chang TT, Lai MD and Wang SW (2011) Identification of hnRNPH1, NF45, and C14orf166 as novel host interacting partners of the mature hepatitis C virus core protein. *J Proteome Res* 10:4522-34. doi: 10.1021/pr200338d
25. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ and Hahn YS (2000) Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 106:1239-49. doi: 10.1172/JCI10323
26. Kang SM, Shin MJ, Kim JH and Oh JW (2005) Proteomic profiling of cellular proteins interacting with the hepatitis C virus core protein. *Proteomics* 5:2227-37. doi: 10.1002/pmic.200401093
27. Kurokawa Y, Honma K, Takemasa I, Nakamori S, Kita-Matsuo H, Motoori M, Nagano H, Dono K, Ochiya T, Monden M and Kato K (2006) Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a new approach to identify novel tumor markers. *Int J Oncol* 28:383-91.
28. Lai CK, Jeng KS, Machida K and Lai MM (2008) Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A. *J Virol* 82:8838-48. doi: 10.1128/JVI.00398-08
29. Chatel-Chaix L, Melancon P, Racine ME, Baril M and Lamarre D (2011) Y-box-binding protein 1 interacts with hepatitis C virus NS3/4A and influences the equilibrium between

- viral RNA replication and infectious particle production. *J Virol* 85:11022-37. doi: 10.1128/JVI.00719-11
30. Pichlmair A, Kandasamy K, Alvisi G, Mulhern O, Sacco R, Habjan M, Binder M, Stefanovic A, Eberle CA, Goncalves A, Burckstummer T, Muller AC, Fauster A, Holze C, Lindsten K, Goodbourn S, Kochs G, Weber F, Bartenschlager R, Bowie AG, Bennett KL, Colinge J and Superti-Furga G (2012) Viral immune modulators perturb the human molecular network by common and unique strategies. *Nature* 487:486-90. doi: 10.1038/nature11289
  31. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K and Matsuura Y (2005) Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 79:13473-82. doi: 10.1128/JVI.79.21.13473-13482.2005
  32. Zech B, Kurtenbach A, Krieger N, Strand D, Blencke S, Morbitzer M, Salassidis K, Cotten M, Wissing J, Obert S, Bartenschlager R, Herget T and Daub H (2003) Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Gen Virol* 84:555-60.
  33. Nanda SK, Herion D and Liang TJ (2006) The SH3 binding motif of HCV [corrected] NS5A protein interacts with Bin1 and is important for apoptosis and infectivity. *Gastroenterology* 130:794-809. doi: 10.1053/j.gastro.2005.12.030
  34. Taguwa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K and Matsuura Y (2008) Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J Virol* 82:2631-41. doi: 10.1128/JVI.02153-07
  35. Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K and Matsuura Y (2006) Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J* 25:5015-25. doi: 10.1038/sj.emboj.7601367
  36. Wang J, Tong W, Zhang X, Chen L, Yi Z, Pan T, Hu Y, Xiang L and Yuan Z (2006) Hepatitis C virus non-structural protein NS5A interacts with FKBP38 and inhibits apoptosis in Huh7 hepatoma cells. *FEBS Lett* 580:4392-400. doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.002
  37. Barth S, Nesper J, Hasgall PA, Wirthner R, Nytko KJ, Edlich F, Katschinski DM, Stiehl DP, Wenger RH and Camenisch G (2007) The peptidyl prolyl cis/trans isomerase FKBP38 determines hypoxia-inducible transcription factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein stability. *Mol Cell Biol* 27:3758-68. doi: 10.1128/MCB.01324-06
  38. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC and Lempicki RA (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4:P3.

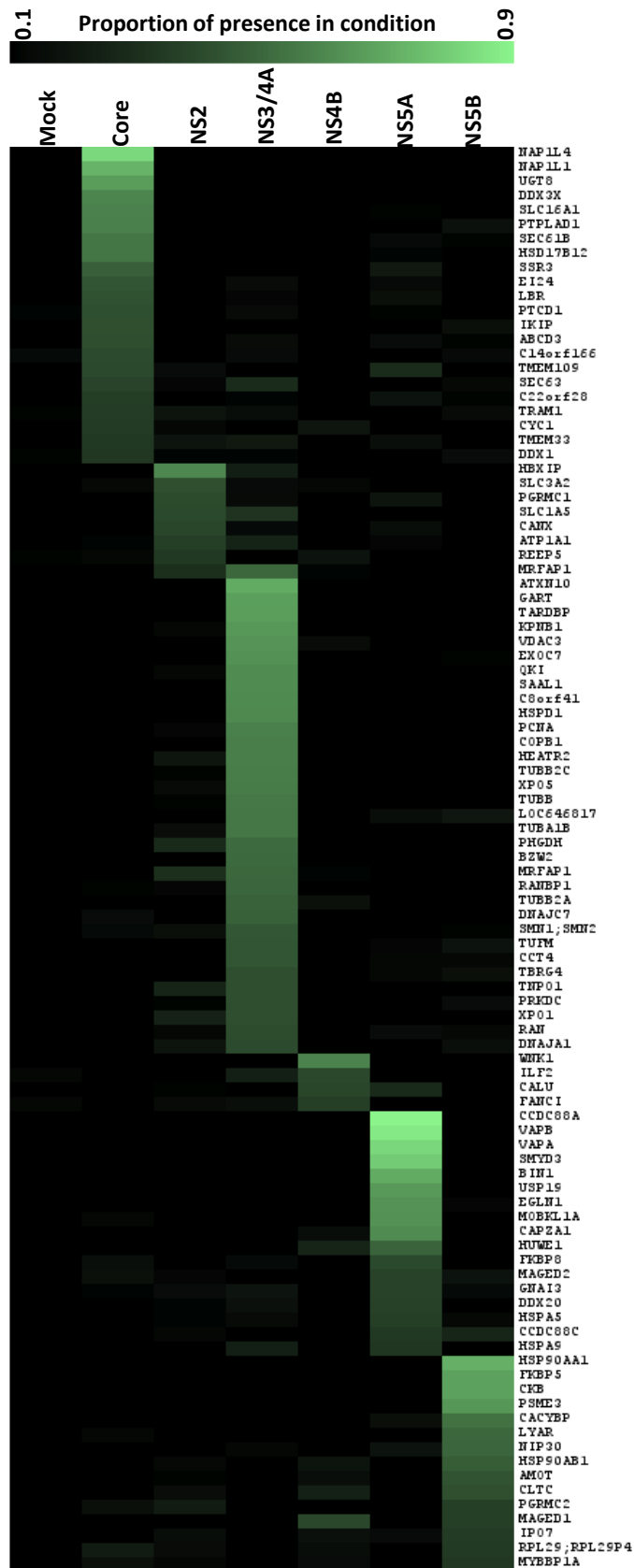
39. Meyniel-Schicklin L, de Chasse B, Andre P and Lotteau V (2012) Viruses and interactomes in translation. *Mol Cell Proteomics* 11:M111 014738. doi: 10.1074/mcp.M111.014738
40. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T and Suzuki T (2009) Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol* 83:5137-47. doi: 10.1128/JVI.02179-08
41. Benichou S, Bomsel M, Bodeus M, Durand H, Doute M, Letourneur F, Camonis J and Benarous R (1994) Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic. *J Biol Chem* 269:30073-6.
42. Janvier K, Craig H, Le Gall S, Benarous R, Guatelli J, Schwartz O and Benichou S (2001) Nef-induced CD4 downregulation: a diacidic sequence in human immunodeficiency virus type 1 Nef does not function as a protein sorting motif through direct binding to beta-COP. *J Virol* 75:3971-6. doi: 10.1128/JVI.75.8.3971-3976.2001
43. Wu W, Tran KC, Teng MN, Heesom KJ, Matthews DA, Barr JN and Hiscox JA (2012) The interactome of the human respiratory syncytial virus NS1 protein highlights multiple effects on host cell biology. *J Virol* 86:7777-89. doi: 10.1128/JVI.00460-12
44. Komarova AV, Combredet C, Meyniel-Schicklin L, Chapelle M, Caignard G, Camadro JM, Lotteau V, Vidalain PO and Tangy F (2011) Proteomic analysis of virus-host interactions in an infectious context using recombinant viruses. *Mol Cell Proteomics* 10:M110 007443. doi: 10.1074/mcp.M110.007443
45. Rozenblatt-Rosen O, Deo RC, Padi M, Adelmant G, Calderwood MA, Rolland T, Grace M, Dricot A, Askenazi M, Tavares M, Pevzner SJ, Abderazzaq F, Byrdsong D, Carvunis AR, Chen AA, Cheng J, Correll M, Duarte M, Fan C, Feltkamp MC, Ficarro SB, Franchi R, Garg BK, Gulbahce N, Hao T, Holthaus AM, James R, Korkhin A, Litovchick L, Mar JC, Pak TR, Rabello S, Rubio R, Shen Y, Singh S, Spangle JM, Tasan M, Wanamaker S, Webber JT, Roecklein-Canfield J, Johannsen E, Barabasi AL, Beroukhi R, Kieff E, Cusick ME, Hill DE, Munger K, Marto JA, Quackenbush J, Roth FP, DeCaprio JA and Vidal M (2012) Interpreting cancer genomes using systematic host network perturbations by tumour virus proteins. *Nature* 487:491-5. doi: 10.1038/nature11288
46. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM and Rice CM (1993) Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polypeptide cleavage sites. *J Virol* 67:2832-43.
47. Zhang R, Durkin J, Windsor WT, McNemar C, Ramanathan L and Le HV (1997) Probing the substrate specificity of hepatitis C virus NS3 serine protease by using synthetic peptides. *J Virol* 71:6208-13.

48. Ou SH, Wu F, Harrich D, Garcia-Martinez LF and Gaynor RB (1995) Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol* 69:3584-96.
49. Ling SC, Albuquerque CP, Han JS, Lagier-Tourenne C, Tokunaga S, Zhou H and Cleveland DW (2010) ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13318-23. doi: 10.1073/pnas.1008227107
50. Gallo LI, Lagadari M, Piwien-Pilipuk G and Galigniana MD (2011) The 90-kDa heat-shock protein (Hsp90)-binding immunophilin FKBP51 is a mitochondrial protein that translocates to the nucleus to protect cells against oxidative stress. *J Biol Chem* 286:30152-60. doi: 10.1074/jbc.M111.256610
51. Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44-57. doi: 10.1038/nprot.2008.211
52. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D and Wakita T (2006) Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc* 1:2334-9. doi: 10.1038/nprot.2006.395
53. Razick S, Magklaras G and Donaldson IM (2008) iRefIndex: a consolidated protein interaction database with provenance. *BMC Bioinformatics* 9:405. doi: 10.1186/1471-2105-9-405
54. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL and Ideker T (2011) Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* 27:431-2. doi: 10.1093/bioinformatics/btq675

## FIGURES

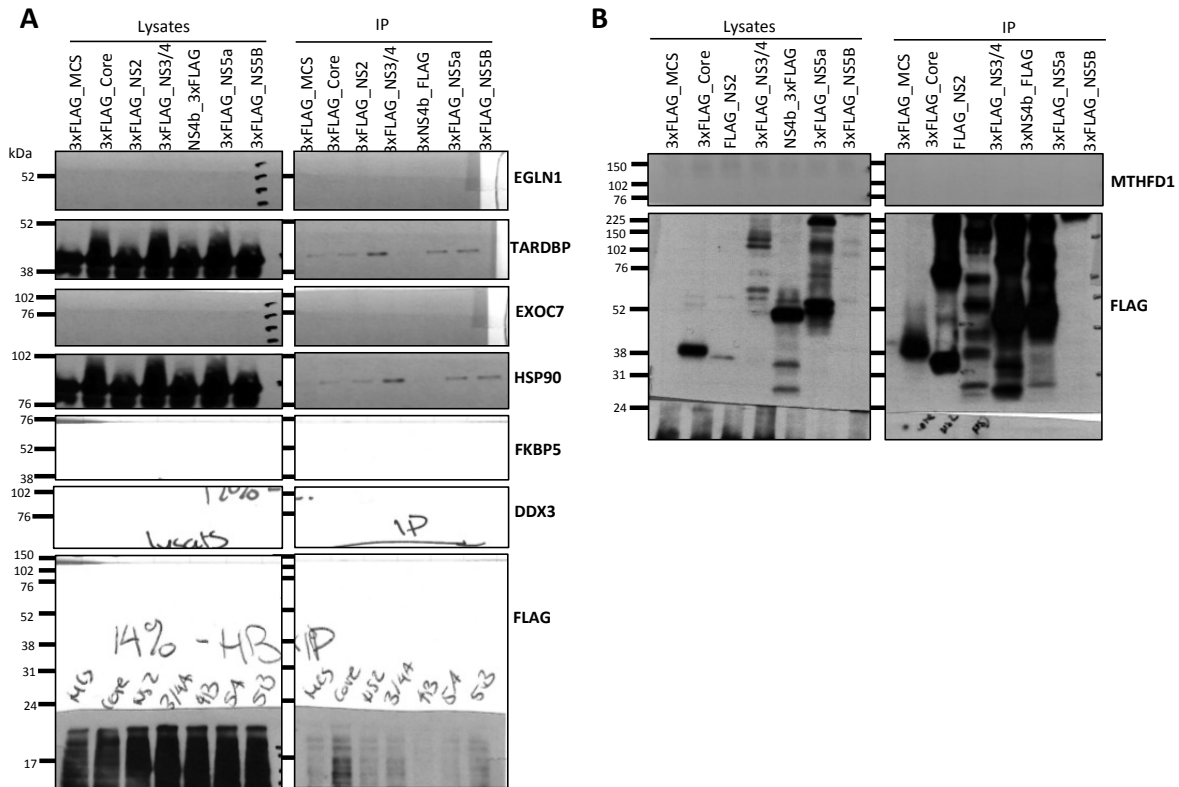


**Figure 1. Immunopurification of viral proteins.** Briefly, 3xFLAG-tagged viral proteins were expressed in 293T cells. Lysates were incubated with FLAG-resin, and resin was extensively washed prior to ammonium hydroxide elution, thus enriching viral protein and its attached host-proteins/complexes, and submitted to MS/MS analysis (A). Detection of the viral-tag protein at expected weight shows its proper expression (Left panel) and efficient IP (right panel) (B). Silver staining of SDS-PAGE gel of different condition shows the viral protein (beside the red dot) and other bands corresponding to co-immunopurified host proteins (C).

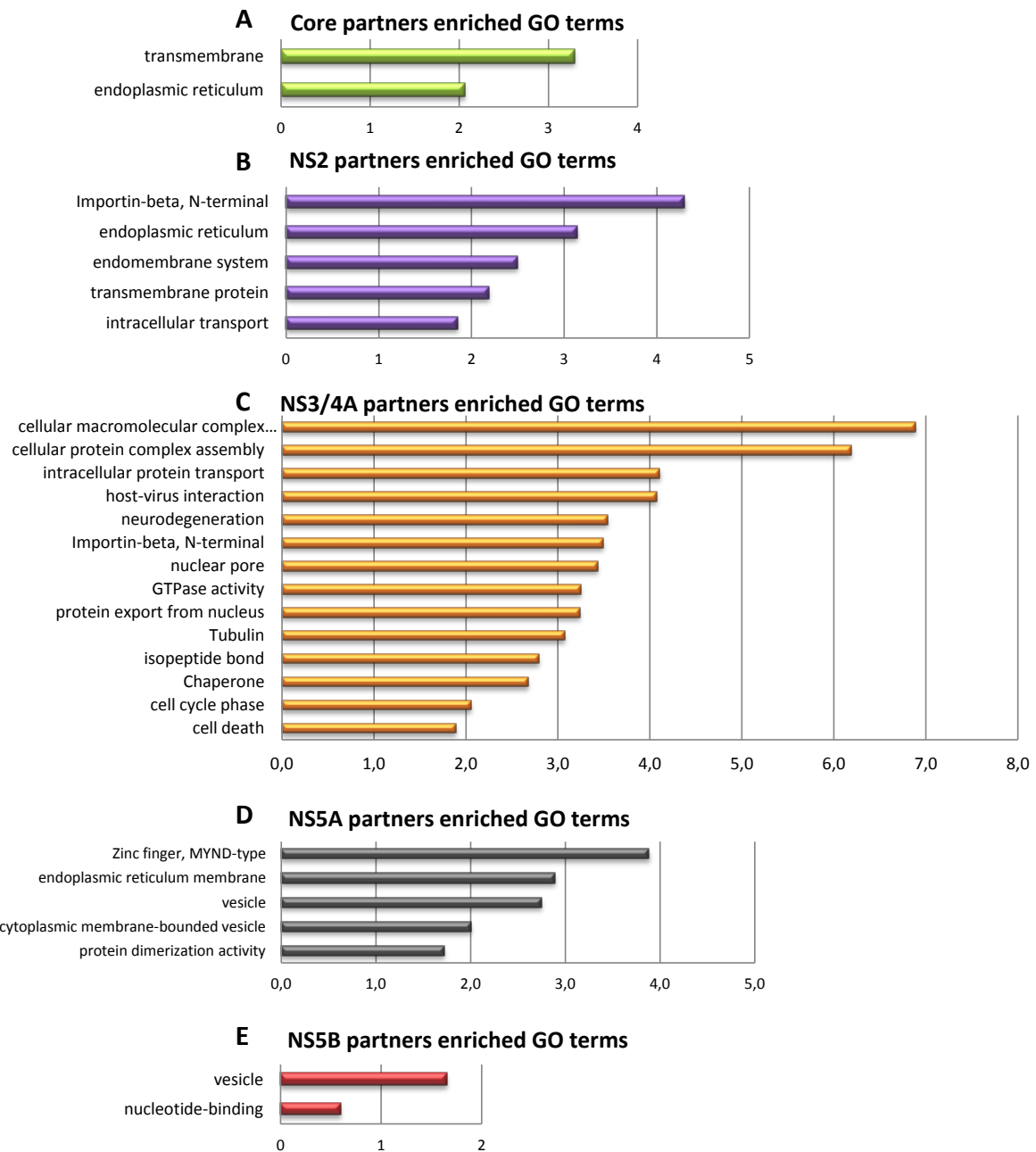


**Figure 2. Heat map representation of enriched host proteins for each bait.** Proportions of presence for each of the seven experimental conditions are represented for host proteins hits ( $\sum$  seven conditions=1 for each host protein). The darker color correlates with the absence of the host protein in the condition, and brighter green indicates a high prevalence of the host protein in the condition. Orders of hit representation are in function of viral protein specificity and are sorted by ascending proportion.



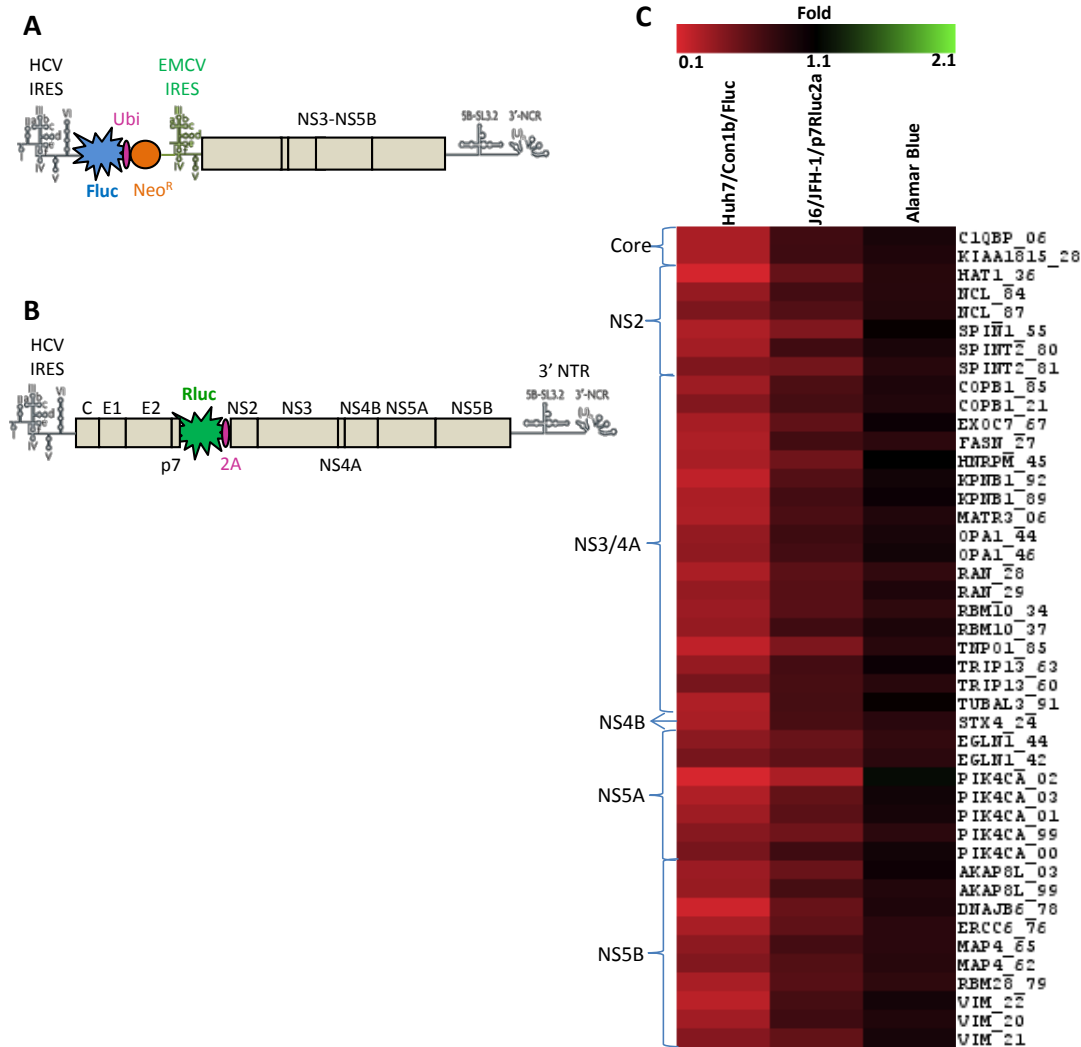


**Figure 3. Specificity of IP-MS/MS validation by IP-Western-blotting.** Previously identified and novel hits retrieved by IP-MS/MS were validated by western blot. DDX3 is present and specific to Core condition, TARDBP, MTHFD1, and EXOC7 are novel NS3/4A hits, EGLN1 is highly specific to NS5A and finally FKBP5 and HSP90 immunoprecipitates with NS5B. Flag immunoblot demonstrate the expression of the viral protein in the lysates and their pull-down.

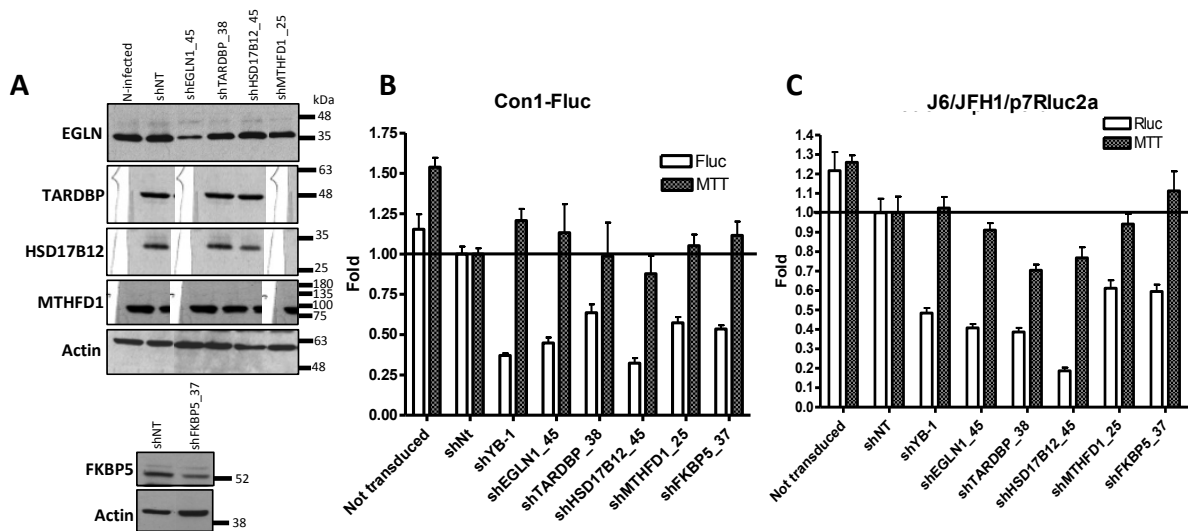


**Figure 4. Gene Ontology enrichment.** Group of hits proteins corresponding to their viral bait protein were studied to determine GO term enrichments.  $-\log_2$  p-value is used to quantify enrichment. There were few Core and NS2 term enrichments (A-B). NS3/4A hit proteins were the most numerous and several enriched terms could be extracted. Terms relevant to complex assembly, transport and protein folding, were found in this condition (C). Terms

corresponding to ER localization and membrane organization were found in NS5A hit protein list (D). Surprisingly, there was extremely few terms enrichment corresponding to the NS5B gene hit list (E).



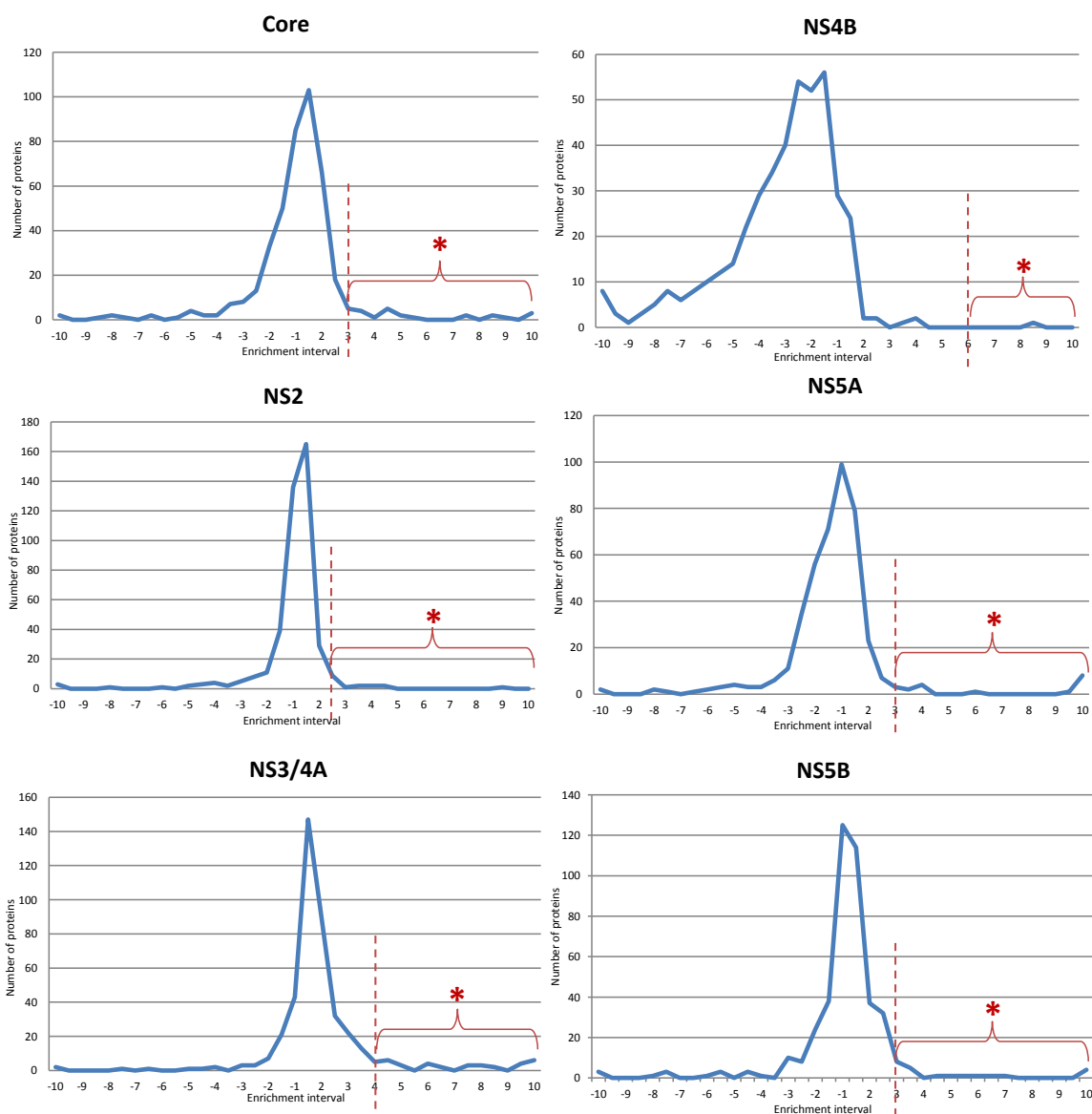
**Figure 5. shRNA mini-screen hits.** Huh7.5-Con1-Fluc and J6/JFH-1-p7Rluc2a are represented (A and B, respectively) In order to select hits, threshold were applied as follows: hit must an effect of  $\geq 25\%$  decrease of viral replication on J6/JFH-1 model and a maximum Alamar blue effect of  $\geq 20\%$ . Moreover, 2 shRNAs corresponding to those criterias were selected in case of a  $\geq 50\%$  decrease in Con1b system, or hit must have an effect of  $\geq 70\%$  decrease on Con1b system if only one shRNA was efficient. Hits are clustered by their corresponding viral binding-partners, and the last two digits of hits name correspond to the shRNA TRCN number from Sigma bank.



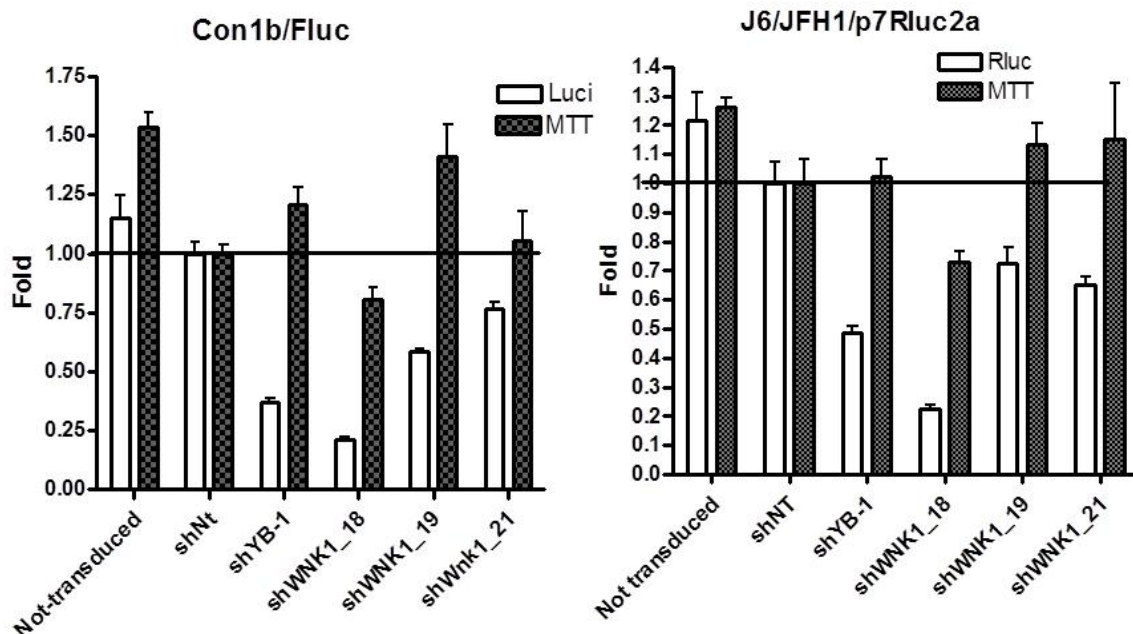
**Figure 6. Functional validation of shRNA effect.** First, shRNA silencing effect was evaluated by western blot detection of target proteins. Every tested shRNA had efficient effect, actin immunoblot was performed as a loading control (A). Effect on Con1b replication was measured at MOI 10 and MTT cytotoxicity assay was performed in parallel (B). shRNA effect at MOI 10 was evaluated in infection assay, and once again compared to MTT for cytotoxicity (C).



## SUPPLEMENTARY INFORMATION



**Supplementary Figure 1. Frequency Gaussian curves of enrichment factor.** For each of the 426 host protein detected in the analysis, enrichment factor was calculated and for each condition and frequency table were generated. Those frequencies are represented by the Gaussian curve as shown for Core (A), NS2 (B), NS3/4A (C), NS4B (D), NS5A (E) and NS5B (F). Upper 5 % enriched genes were selected for TmeV representation at figure 2.



**Supplementary Figure 2. WNK1 importance in HCV vRNA replication.** Effect on Con1b replication was measured at MOI 10 for 3 different shRNAs, and MTT cytotoxicity assay was performed in parallel (A). shRNA effect at MOI 10 was evaluated in infection assay for the same shRNAs, and compared to MTT for cytotoxicity (B). shRNA targeting YB-1 was used as a control. shRNA TRCN0000000918 had the highest effect in both assays.



Core				
IPI number	HUGO	Name	Number of peptides	Fold enrichment
IPI00017763	NAP1L4	Nucleosome assembly protein 1-like 4	27	28,29
IPI00023860	NAP1L1	Nucleosome assembly protein 1-like 1	16	15,84
IPI00294455	UGT8	2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase	8	11,78
IPI00215637	DDX3X	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	23	8,72
IPI00024650	SLC16A1	Monocarboxylate transporter 1	4	8,38
IPI00008998	PTPLAD1	Protein tyrosine phosphatase-like protein PTPLAD1	3	8,24
IPI00220835	SEC61B	Protein transport protein Sec61 subunit beta	4	7,18
IPI00007676	HSD17B12	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12	9	7,16
IPI00009235	SSR3	Translocon-associated protein subunit gamma	2	5,42
IPI00023185	EI24	Isoform 2 of Etoposide-induced protein 2.4 homolog	3	4,75
IPI00292135	LBR	Lamin-B receptor	6	4,56
IPI00171925	PTCD1	Pentatricopeptide repeat protein 1	2	4,40
IPI00797136	IKIP	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein	3	4,39
IPI00002372	ABCD3	ATP-binding cassette sub-family D member 3	5	4,32
IPI00792100	C14orf166	Chromosome 14 open reading frame 166	6	4,07
IPI00031697	TMEM109	Transmembrane protein 109	2	4,02
IPI00218922	SEC63	Translocation protein SEC63 homolog	2	3,63
IPI00550689	C22orf28	Chromosome 22 open reading frame 28	6	3,32
IPI00219111	TRAM1	Translocation-associated membrane protein 1	3	3,27
IPI00029264	CYC1	Cytochrome c1	3	3,18
IPI00299084	TMEM33	Transmembrane protein 33	2	3,06
IPI00293655	DDX1	ATP-dependent RNA helicase DDX1	4	3,00
IPI00014230	C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein	7	2,09

NS2				
IPI number	HUGO	Name	Number of peptides	Fold enrichment
IPI00012831	HBXIP	Hepatitis B virus x-interacting protein	2	8,97
IPI00554702	SLC3A2	Solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport)	7	4,36
IPI00220739	PGRMC1	Membrane-associated progesterone receptor component 1	5	4,08
IPI00019472	SLC1A5	Neutral amino acid transporter B(0)	5	3,99
IPI00020984	CANX	Calnexin	17	3,82
IPI00646182	ATP1A1	ATPase; Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting; alpha 1	22	3,40
IPI00744902	REEP5	Receptor accessory protein 5	2	3,05
IPI00020915	MRFAP1	MORF4 family-associated protein 1	2	2,61

NS3/4A				
IPI number	HUGO	Name	Number of peptides	Fold enrichment
IPI00001636	ATXN10	Ataxin-10	4	14,20
IPI00025273	GART	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	2	12,23
IPI00025815	TARDBP	TAR DNA binding protein	7	11,93
IPI00001639	KPNB1	Importin subunit beta-1	18	11,07
IPI00031804	VDAC3	Isoform 1 of Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	6	10,37
IPI00172532	EXOC7	Isoform 1 of Exocyst complex component 7	3	10,15
IPI00736672	QKI	Protein quaking	4	9,40
IPI00304935	SAAL1	Serum amyloid A-like 1	2	9,38
IPI00306207	C8orf41	TELO2 interacting protein 2	3	9,23
IPI00784154	HSPD1	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	25	9,17
IPI00021700	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	5	8,28
IPI00295851	COPB1	Coatomer subunit beta	2	8,03
IPI00242630	HEATR2	HEAT repeat-containing protein 2	4	7,99
IPI00007752	TUBB2C	Tubulin beta-2C chain	7	7,79
IPI00640703	XPO5	Exportin-5	13	7,69
IPI00011654	TUBB	Tubulin beta chain	42	7,41
IPI00735319	LOC646817	LOC646817 similar to template acyivating factor-I alpha	2	7,33
IPI00792677	TUBA1B	Tubulin alpha-ubiquitous chain	30	7,31
IPI00011200	PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	20	6,21
IPI00894416	BZW2	Basic leucine zipper and W2 domains 2	3	6,16
IPI00020915	MRFAP1	MORF4 family-associated protein 1	2	5,96
IPI00878075	RANBP1	RAN binding protein 1	4	5,86
IPI00013475	TUBB2A	Tubulin beta-2A chain	3	5,57
IPI00329629	DNAJC7	DnaJ homolog subfamily C member 7	3	5,51
IPI00009597	SMN1;SMN2	Isoform SMN-delta7 of Survival motor neuron protein	3	4,81
IPI00027107	TUFM	Tu translation elongation factor	7	4,78
IPI00302927	CCT4	T-complex protein 1 subunit delta	9	4,73
IPI00329625	TBRG4	Transforming growth factor beta regulator 4 (TBRG4)	4	4,30
IPI00024364	TNPO1	Transportin 1 isoform 1	4	4,27
IPI00296337	PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	33	4,26
IPI00298961	XPO1	Exportin-1	15	4,25
IPI00792352	RAN	RAN, member RAS oncogene family	4	4,15
IPI00012535	DNAJA1	DnaJ homolog subfamily A member 1	6	4,02

NS4B				
IPI number	HUGO	Name	Number of peptides	Fold enrichment
IPI00004472	WNK1	Serine/threonine-protein kinase WNK1	2	8,47
IPI00005198	ILF2	Interleukin enhancer-binding factor 2	2	3,95
IPI00789155	CALU	Calumenin	2	3,85
IPI00306518	FANCI	Fanconi anemia group I protein	6	3,37

NSSA				
IPI number	HUGO	Name	Number of peptides	Fold enrichment
IPI00171134	CCDC88A	Girdin	2	168,65
IPI00006211	VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	14	41,56
IPI00640416	VAPA	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A; 33kDa	12	28,11
IPI00165073	SMYD3	SET and MYND domain-containing protein 3	5	22,96
IPI00220996	BIN1	Bridging integrator 1	21	14,32
IPI00016589	USP19	Ubiquitin specific peptidase 19	21	11,14
IPI00004928	EGLN1	Egl nine homolog 1	10	10,25
IPI00872556	MOBK1A	Mps one binder kinase activator-like 1A	7	10,12
IPI00873484	CAPZA1	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1	3	9,38
IPI00445401	HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase	3	5,69
IPI00640341	FKBP8	FK506-binding protein 8	3	3,98
IPI00337823	MAGED2	Melanoma-associated antigen D2	10	3,60
IPI00220578	GNAI3	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3	3	3,59
IPI00005904	DDX20	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20	2	3,54
IPI00003362	HSPA5	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	15	3,41
IPI00740019	CCDC88C	Coiled-coil domain containing 88C	3	3,07
IPI00007765	HSPA9	Stress-70 protein	16	2,98

NSSB				
IPI number	HUGO	Name	Number of peptides	Fold enrichment
IPI00382470	HSP90AA1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic); class A member 1	19	15,18
IPI00218775	FKBP5	FK506-binding protein 5	12	12,50
IPI00022977	CKB	Creatine kinase B-type	3	12,45
IPI00030243	PSME3	Proteasome activator complex subunit 3	12	10,78
IPI00395627	CACYBP	Calcyclin-binding protein	4	6,78
IPI00015838	LYAR	Cell growth-regulating nucleolar protein	2	6,04
IPI00178750	NIP30	NEFA-interacting nuclear protein NIP30	4	5,83
IPI00414676	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	36	5,32
IPI00163085	AMOT	Angiomotin	20	4,62
IPI00455383	CLTC	Clathrin heavy chain 1	3	4,39
IPI00005202	PGRMC2	Membrane-associated progesterone receptor component 2	3	3,40
IPI00398845	MAGED1	Melanoma-associated antigen D1	6	3,39
IPI00007402	IPO7	Importin-7	5	3,18
IPI00796934	RPL29	ribosomal protein L29 (RPL29)	7	3,07
IPI00607584	MYBBP1A	Myb-binding protein 1A	6	3,00

**Supplementary Table 1. IP-MS/MS data: fold enrichments.** The table provides the list of the hits of the IP-MS/MS statistically enriched for each baits (except for C1QBP, ILF2, CALU, FANCI and MTHFD1 which were included even though they are not statistically enriched). Corresponding IPI number, HUGO annotation and name are provided, together with the number of peptides identified in MS/MS analysis and fold enrichment.

*Dans le cadre de ce mémoire, la Table supplémentaire 2 est disponible en appendice afin d'alléger le contenu du document.*

**Supplementary Table 2. shRNA screening results.** Average and standard deviation for Con1b, J6/JFH-1 and Alamar blue assays are provided for every shRNA tested. The table includes the Sigma TRCN number of the shRNA, the NM ID, IPI number, HUGO annotation short name, and the viral bait from which the hit was retrieved. An additional column was included to indicate which hit was statistically enriched in the MS/MS analysis.

Viral-IP	IPI No	Hugo	Name	de chassey Y2H study [1]	Evidence of binding	DRM studies	RNAi effect
Core	IPI00017763	NAP1L4	Nucleosome assembly protein 1-like 4		[2]		
Core	IPI00023860	NAP1L1	Nucleosome assembly protein 1-like 1	NS3	[2]		
Core	IPI00215637	DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	CORE	[2, 3]		[4, 5]
Core	IPI00007676	HSD17B12	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12			[6]	
Core	IPI00171925	PTCD1	Pentatricopeptide repeat domain 1				[5]
Core	IPI00792100	C14orf166	Chromosome 14 open reading frame 166		[3]		
Core	IPI00550689	C22orf28	Chromosome 22 open reading frame 28		[3]		
NS2	IPI00020984	CANX	Calnexin	E1			[4]
NS3/4A	IPI00025815	TARDBP	TAR DNA binding protein		[7]		
NS3/4A	IPI00001639	KPNB1	Karyopherin (importin) beta 1		[8]		
NS3/4A	IPI00784154	HSPD1	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	CORE		[9]	
NS3/4A	IPI00295851	COPB1	Coatomer protein complex, subunit beta 1				[10]
NS3/4A	IPI00007752	TUBB2C	Tubulin, beta 4B class IVb	NS5B			
NS3/4A	IPI00013475	TUBB2A	Tubulin, beta 2A class IIa			[6]	
NS3/4A	IPI00792352	RAN	RAN, member RAS oncogene family				[10]
NS5A	IPI00006211	VAPB	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein B/C	NS5A	[2]	[6]	[4]
NS5A	IPI00640416	VAPA	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A, 33kDa	NS5A	[2]	[6]	[4]
NS5A	IPI00165073	SMYD3	SET and MYND domain containing 3	NS5A	[2]		
NS5A	IPI00220996	BIN1	Bridging integrator 1	NS5A	[2]		
NS5A	IPI00789672	USP19	Ubiquitin specific peptidase 19	NS5A	[2]		
NS5A	IPI00640341	FKBP8	FK506 binding protein 8, 38kDa		[2]		
NS5A	IPI00003362	HSPA5	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	E1			
NS5B	IPI00022977	CKB	Creatine kinase B-type			[9]	
NS5B	IPI00030243	PSME3	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)	CORE			
NS5B	IPI00414676	HSP90AB1	HSP90AB1 Heat shock protein HSP 90-beta			[9]	
NS5B	IPI00005202	PGRMC2	Progesterone receptor membrane component 2			[6]	
NS5B	IPI00398845	MAGED1	Melanoma antigen family D, 1	NS3			

## References:

- de Chassey B, Navratil V, Tafforeau L, Hiet MS, Aublin-Gex A, Agaogue S, Meiffren G, Pradezynski F, Faria BF, Chantier T, Le Breton M, Pellet J, Davoust N, Mangeot PE, Chaboud A, Penin F, Jacob Y, Vidalain PO, Vidal M, Andre P, Rabourdin-Combe C and Lotteau V (2008) Hepatitis C virus infection protein network. *Mol Syst Biol* 4:230. doi: 10.1038/msb.2008.66
- Pichlmair A, Kandasamy K, Alvisi G, Mulhern O, Sacco R, Habjan M, Binder M, Stefanovic A, Eberle CA, Goncalves A, Burckstummer T, Muller AC, Fauster A, Holze C, Lindsten K, Goodbourn S, Kochs G, Weber F, Bartenschlager R, Bowie AG, Bennett KL, Colinge J and Superti-Furga G (2012) Viral immune modulators perturb the human molecular network by common and unique strategies. *Nature* 487:486-90. doi: 10.1038/nature11289
- Lee JW, Liao PC, Young KC, Chang CL, Chen SS, Chang TT, Lai MD and Wang SW (2011) Identification of hnRNPH1, NF45, and C14orf166 as novel host interacting partners of the mature hepatitis C virus core protein. *J Proteome Res* 10:4522-34. doi: 10.1021/pr200338d
- Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, Landthaler M, Landgraf P, Kan S, Lindenbach BD, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Brownstein MJ, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T and Rice CM (2007) Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12884-9. doi: 10.1073/pnas.0704894104

5. Li Q, Brass AL, Ng A, Hu Z, Xavier RJ, Liang TJ and Elledge SJ (2009) A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16410-5. doi: 10.1073/pnas.0907439106
6. Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Jr. and Ye J (2007) Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5848-53. doi: 10.1073/pnas.0700760104
7. Lai CK, Jeng KS, Machida K and Lai MM (2008) Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A. *J Virol* 82:8838-48. doi: 10.1128/JVI.00398-08
8. Chatel-Chaix L, Melancon P, Racine ME, Baril M and Lamarre D (2011) Y-box-binding protein 1 interacts with hepatitis C virus NS3/4A and influences the equilibrium between viral RNA replication and infectious particle production. *J Virol* 85:11022-37. doi: 10.1128/JVI.00719-11
9. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T and Suzuki T (2009) Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol* 83:5137-47. doi: 10.1128/JVI.02179-08
10. Tai AW, Benita Y, Peng LF, Kim SS, Sakamoto N, Xavier RJ and Chung RT (2009) A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* 5:298-307. doi: 10.1016/j.chom.2009.02.001

**Supplementary Table 3. Crosscheck between IP-MS/MS hits and literature.** Viral bait is indicated at the right of hit protein. Viral bait from de chassey study is indicated, followed by presence in detergent-resistant membrane composition studies (by MS/MS analysis) and finally genome-wide RNAi studies from which the retrieved protein was a hit. IP-MS/MS which did not correspond to neither of the other studies were not included in the table.

## **Chapitre 3**

## **Discussion**

### 3.1 RÉSEAU D'INTERACTIONS

Dans la première phase du projet, une approche d'immunoprécipitation couplée à une détection MS/MS fut utilisée afin de déterminer les interactants du VHC. Contrairement à l'étude précédente ayant mené à l'identification de YB-1, les expériences conduites au cours de mon projet de recherche furent menées dans des cellules embryonnaires rénales humaines (293T) et les immunopurifications furent basées sur une étiquette 3xFLAG (plutôt qu'un TAP-tag (Chatel-Chaix et al., 2011)). Ces modifications étaient essentielles afin d'avoir une quantité suffisante de matériel à soumettre à l'analyse MS/MS. En effet, les cellules 293T permettent un niveau d'expression protéique élevé et cela était nécessaire afin d'effectuer les sept conditions en parallèle. Pour cette raison, l'utilisation d'une lignée cellulaire de rein (293T) fut favorisée par rapport à l'usage d'une lignée d'origine hépatique. Bien que les profils d'expression protéique de ces deux lignées soit un peu divergent, il a été démontré récemment que les cellules 293T peuvent soutenir un cycle viral complet (de l'entrée jusqu'à la relâche de virions) suite à l'expression exogène de facteurs essentiels à sa réplication, ce qui justifie l'usage de ce modèle cellulaire (Da Costa et al., 2012). L'utilisation d'un vecteur d'expression peut aussi entraîner de faux positifs, puisque la protéine virale est exprimée à des niveaux supérieurs aux niveaux observés lors d'infection virale dans une cellule. Il est cependant intéressant de relever le fait que, lors d'une infection virale, les protéines du VHC sont accumulées et sont présentes à des concentrations supérieures à ce qui est nécessaire à la réplication et la production de virions (Miyinari et al., 2003).

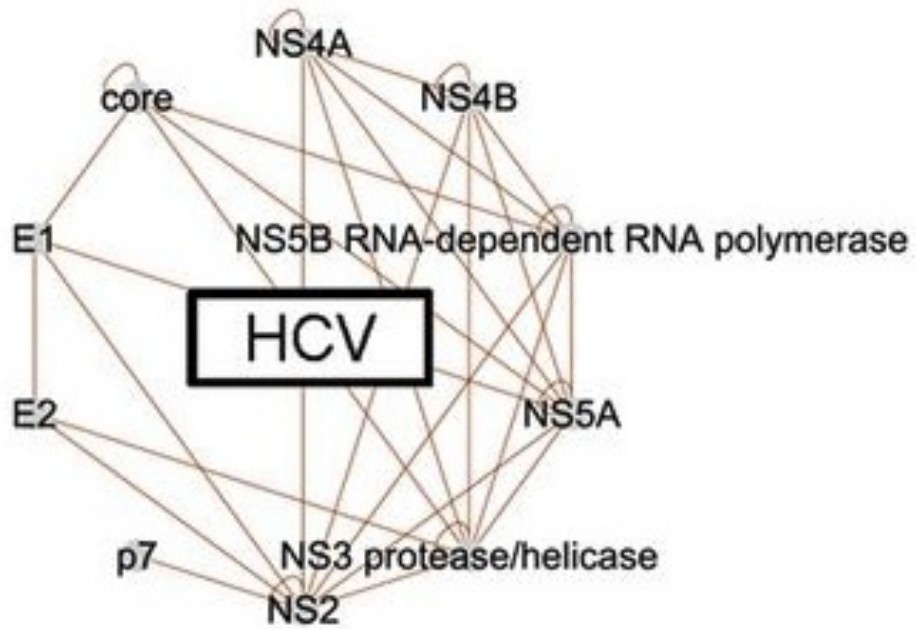
L'étude des interactions par l'approche IP-MS/MS possède plusieurs avantages par rapport aux études de doubles hybrides, entre autres puisqu'elle se déroule dans un modèle eucaryote. Ces études permettent l'expression des protéines virales complètes plutôt que des fragments, et leur localisation cellulaire est représentative du contexte naturel (contrairement aux études doubles hybrides où les protéines doivent être importées au noyau). Plus spécifiquement, dans cette étude elle a permis d'identifier des facteurs de l'hôte reliés aux membranes pour Core et NS2, tel que démontré par les études de GO terms. Ce type



d'interaction est difficile à identifier par une approche double hybride. D'autres parts, il est fort intéressant de relever le fait que le niveau de recouvrement avec les autres études d'interaction est élevé, ce qui porte à penser que l'achèvement de l'interactome du VHC est imminent.

L'étude a aussi permis d'identifier des facteurs de transport cellulaires interagissant avec NS3/4A tels que les protéines de transport nucleocytoplasmique (RAN, RANBP1, XPO5) et les karyopherines (KPNB1, TNPO1, XPO1). Cette dernière classe est d'autant plus intéressante puisque ces interactions pourraient influencer la localisation d'autres protéines, tel que STAT1 dans le cas des karyopherines, et ainsi influencer la signalisation cellulaire.

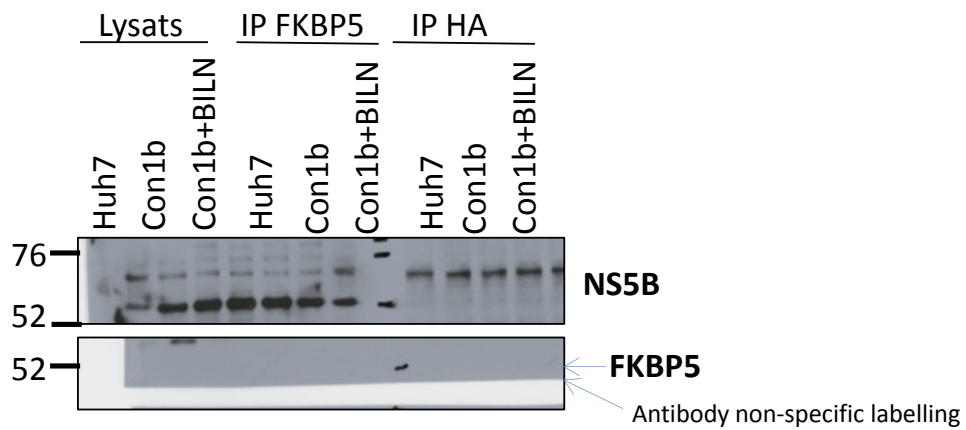
Dans le contexte du projet, le but était de trouver des interactants spécifiques aux protéines virales. Les protéines du VHC interagissent entre elles et sont hautement interconnectées (Figure 3.1). De ce fait, si les immunoprécipitations avaient été effectuées en contexte viral, il aurait été difficile de discerner les interactions directes et les protéines spécifiques. Par exemple, une protéine interagissant avec NS5A aurait aussi pu se retrouver dans la condition Core, NS2, NS3/4A, NS4B, et être ainsi considérée comme une protéine contaminante. Bien que l'étude des complexes soit très intéressante, dans le contexte du projet nous nous intéressons particulièrement aux protéines interagissant directement avec des protéines du VHC. Dans un objectif de découverte de médicament, l'idéal serait de trouver une petite molécule ciblant l'interface de contact entre la protéine virale et la protéine de l'hôte, en augmentant ainsi la barrière-de-résistance (probabilité d'apparition de mutants de résistance beaucoup moindre) et en diminuant la possibilité d'effets secondaires en ciblant une interface spécifique au virus.



**Figure 3.1** Interaction intravirales

Cette figure représente les liens d'interaction entre les protéines virales et illustre l'importante intra-connectivité du réseau. (adaptée de (Meyniel-Schicklin et al., 2012))

De plus amples expériences de validation seront nécessaires dans la poursuite de ce projet de recherche. En plus de valider les interactions dans un système d'expression 293T tel que montré à la Figure 4 du manuscrit, il sera intéressant d'observer l'interaction dans un contexte viral tel qu'une lignée exprimant le réplicon de façon stable (Huh7-Con1-Fluc) ou un système infectieux tel que J6/JFH-1/p7Rluc2a. De plus, l'IP réciproque, c'est-à-dire une IP de la protéine de l'hôte par un anticorps spécifique, permettrait de confirmer l'interaction à un niveau d'expression endogène. Dans le cadre de mes recherches, j'ai pu démontrer une telle interaction en immunoprécipitant l'immunophiline FKBP5 (Figure 3.2). En effet, l'IP de cette protéine de l'hôte par un anticorps spécifique anti-FKBP5 dans un système de réplicon sous génomique Con1b (Huh7-Con1-Fluc) permet de démontrer l'interaction avec la protéine virale NS5B de façon spécifique. Alternativement, les protéines de l'hôte, couplées à une séquence 'tag', pourraient être exprimées dans une lignée cellulaire afin de faciliter l'IP par l'utilisation d'anticorps contre le 'tag'. Dans cette optique, des clonages sont en cours pour les cDNA des protéines EGLN, FKBP5, EXOC7, MTHFD1, HBxIP et HSD17B12.



**Figure 3.2 Immunoprécipitation de FKBP5 en contexte de réplication virale.**

Une immunoprécipitation en contexte viral avec un anticorps contre FKBP5 a été effectuée dans une lignée Huh7-Con1-Fluc, une lignée Huh7.5 contrôle et une lignée Huh7-Con1-Fluc traitée avec l'inhibiteur de protéase (BILN2061). Un anticorps ciblant l'étiquette histidine (HA) a été utilisé comme contrôle négatif. Dans les lysats cellulaires, il est possible de détecter NS5B dans les conditions Huh7-Con1-Fluc et, dans une proportion beaucoup moindre, la condition réplicon traité au BILN2061. Dans les conditions immunoprécipitées, une bande correspondant à NS5B est aussi détectée spécifiquement dans les cellules réplicons, confirmant l'interaction à des niveaux endogènes.

Dans le même ordre d'idées, des expériences d'immunofluorescence pourraient générer des informations supplémentaires concernant les hits de MS/MS. Est-ce qu'une relocalisation est observée en contexte viral? Est-ce que la protéine de l'hôte colocalise avec sa protéine virale 'proie', ou encore à des structures spécifiques ou compartiments cellulaires importants au cycle viral tel que les gouttelettes lipidiques ou la toile membranaire? Les réponses à ces questions pourront être révélées par expérimentation d'immunofluorescence en utilisant des cellules infectées, que ce soit le modèle JFH-1 (2a) ou le modèle chimérique J6/JFH-1/p7Rluc2a. Les constructions de plasmides codant pour les cDNA fusionnés à un 'tag' pourront aussi être utilisés pour faciliter la détection par immunofluorescence.

Les expériences réalisées au cours de ce projet ne permettent pas de différencier entre une interaction directe ou indirecte. Il est fort probable que certains interactants identifiés font partie d'un complexe et sont immunopurifiés avec une protéine virale par l'entremise d'une interaction secondaire. Des expériences biochimiques devront être effectuées dans le but de caractériser la nature de ces interactions. Deux types d'expériences pourront fournir ce type d'information. Premièrement, des études biochimiques *ex vivo* de GST (glutathione S-transférase) 'pull down' peuvent démontrer la présence d'une interaction directe. Les protéines proie et hameçon, fusionnées à un tag GST, sont exprimées dans un système bactérien et purifiées grâce à une matrice de glutathion. Une protéine hameçon, fusionnée à un tag GST, est immobilisée sur une matrice de glutathion. La proie est séparée du tag GST par une enzyme (thrombine) et récupérée. La solution contenant la proie est mise en présence de l'hameçon, toujours couplée à la GST et la matrice. On observe la présence d'interaction entre les deux protéines sur gel dénaturant (SDS-PAGE) suite à une précipitation. Alternativement, il est possible de détecter une interaction *in vivo* par une étude de rapprochement, tel que le BRET (bioluminescence resonance energy transfer). Les deux protéines sont exprimées dans un système eucaryote : une sera couplée à une molécule 'donneur' et l'autre à une molécule 'accepteur'. Si les deux molécules sont suffisamment rapprochées, il y aura un transfert d'énergie suite à l'ajout de la coelenterazine qui changera le spectre d'émission de cette dernière. Ces deux techniques pourront être mises à profits dans un avenir rapproché afin de mieux caractériser les interactions directes.

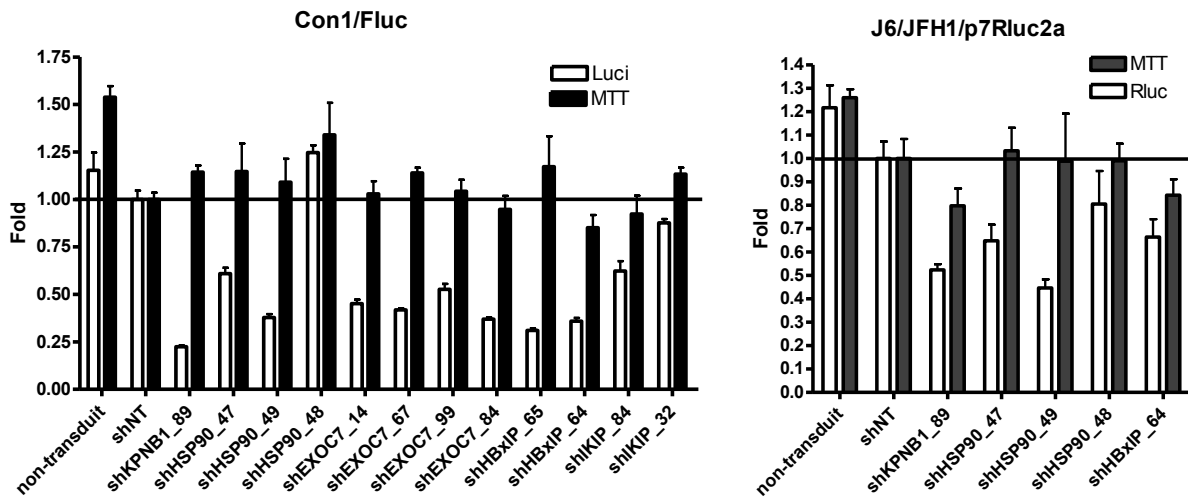
Ces données de spectrométrie de masse seront intégrées aux bases de données disponibles par l'entremise d'une collaboration avec l'équipe de Vincent Lotteau. Il sera intéressant dans le futur de construire un réseau d'interaction avec toutes les données disponibles dans la littérature et extraites des expériences de doubles hybrides, afin de mettre à jour les protéines de nature *hub* ou les complexes importants au VHC.

### 3.2 IMPLICATION FONCTIONNELLE DES INTERACTIONS

L'étude fonctionnelle a permis de relier interaction et fonction. Le crible était biaisé pour des protéines liant les protéines virales, et tel qu'attendu, le silençage de plusieurs protéines identifiées ont affecté négativement la réplication virale. La Figure 5 du manuscrit illustre 27 gènes ayant un effet correspondant aux seuils établis. Cependant, plusieurs gènes démontrent un effet significatif dans le crible, la sélection des 'hits' étant dépendante du seuil fixé.

De plus, l'effet fonctionnel de certains autres gènes a pu être validé puisque les shARN n'étaient pas disponible dans la banque. Pour certains autres, la validation du silençage au niveau protéomique (détection par Western blot à la suite du silençage) n'a pu être effectuée (Figure 3.3). Dans de futures expériences, il sera intéressant d'utiliser une approche par qPCR pour déterminer l'efficacité de silençage de chacun des shARN utilisés lorsque l'approche protéique ne peut être utilisée. Les shARN validés seront un outil de travail important à plusieurs expériences futures. Par exemple, des expériences pourront être effectuées dans le but de déterminer quelle étape du cycle viral est affectée par le silençage d'une protéine. Ainsi, l'infection de cellules Huh7.5 par le surnageant de cellules J6/JFH-1/p7Rluc2a dont l'expression d'une protéine est diminué à l'aide d'un shARN validé pourront déterminer son rôle sur l'assemblage/relâche. De plus, l'infectivité intracellulaire pourra être mesuré par l'infection de cellules permissives naïves Huh7.5 par le lysat cellulaire de cellules transduites pourra permettre de discerner entre un shARN affectant la relâche de l'assemblage. Par exemple, lors du silençage d'un gène ayant un effet sur la relâche, l'infectivité intracellulaire ne sera pas affectée par rapport au contrôle (shARN NT), voire augmentée par accumulation de virions dans la cellule, alors que l'infectivité du surnageant sera diminuée. Par opposition, le silençage d'un gène par un shRNA affectant l'assemblage résultera en des infectivités intracellulaire et extracellulaire diminuées par rapport au contrôle. De plus, afin de valider l'effet d'un silençage, tant au niveau répliatif qu'infectieux, il serait intéressant d'effectuer des expériences de *rescue*. En rétablissant l'expression un gène résistant à l'ARNi dans la

cellule, les niveaux de réplication/infectivité devraient être rétablis, démontrant ainsi que l'effet observé était attribuable au silençage du gène.



**Figure 3.3 Effet de différents gènes sur le VHC**

L'effet de certains gènes additionnels à ceux de la Figure 2.6 furent testés. Toutefois, la validation du silençage de ces gènes est à démontrer.



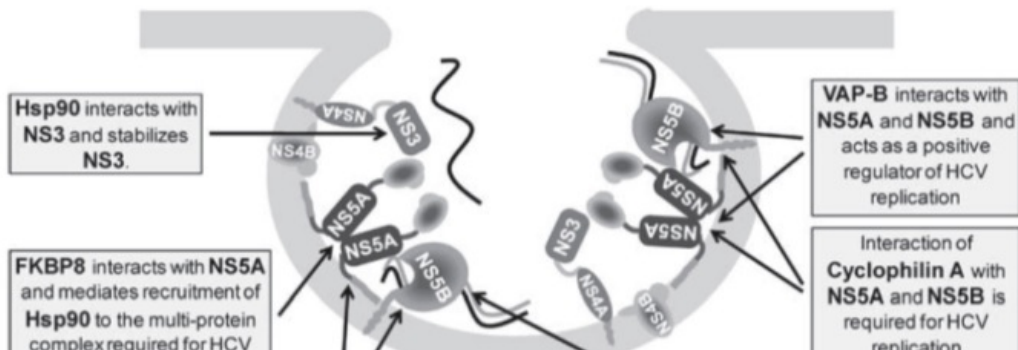
### 3.3 PERSPECTIVES

Parmi les protéines identifiées par l'IP-MS/MS et ayant un effet sur la réplication virale, trois d'entre elles, WNK1 (lysine deficient protein kinase 1), MTHFD1 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP<sup>+</sup> dependent) 1) et FKBP5 (FK506 binding protein 5), possèdent une activité enzymatique contre laquelle des inhibiteurs sont disponibles commercialement (IOX2, PP1, LY345899 pour ELGN1, WNK1 et MTHFD1 respectivement (Schmidt et al., 2000; Tian et al., 2011; Yagi et al., 2009)). Il serait intéressant de voir si des inhibiteurs peuvent avoir le même effet sur la réplication virale que le silençage du gène, signifiant ainsi que l'activité de l'enzyme est importante à la réplication virale. Par exemple, une étude a démontrée que l'activité de la kinase PI4KA, plutôt que sa relocalisation, est primordiale au cycle réplcatif du VHC. Lors de l'utilisation d'inhibiteurs de PI4KA en contexte de réplication virale, la protéine est relocalisé (tel que démontré par des expériences d'immunofluorescence) mais l'inhibition de son activité enzymatique entraine la diminution de réplication virale (Bianco et al., 2012).

Dans la cellule, l'enzyme MTHFD1 est responsable de la biosynthèse de méthionine et la synthèse *de novo* de purine. Il serait intéressant de déterminer, par l'usage d'inhibiteurs, si l'activité de cette enzyme est importante à la réplication virale.

FKBP5 est un cofacteur de HSP90. Cette dernière est impliquée dans le repliement protéique qui est dépendent de cofacteurs tels que Cyp40 ou FKBP5 (PirkI and Buchner, 2001). Ces interactions forment probablement un complexe. Ainsi, il a été démontré dans le cas de FKBP8, que cette dernière interagit avec NS5A et HSP90 de par son domaine tetratricopeptide repeat (TPR). FKBP5 possède également un domaine TPR, et il serait donc logique de croire que l'interaction entre HSP90 et NS5B est secondaire et dépendante de FKBP5 et de son domaine TPR.

Plusieurs rotamases (FKBP8, cyclophilines) ont un rôle essentiel dans le cycle viral du VHC, mais également du VIH, du virus de la stomatite vésiculaire et du virus de la Vaccine (Bose et al., 2003; Castro et al., 2003; Towers, 2007). Dans le cas des immunophilines, le rôle de FKBP8 dans la réplication du VHC est bien caractérisé. Un modèle des différentes interactions avec les immunophilines est disponible à la Figure 3.4.



**Figure 3.4 Modélisation des interactions entre le VHC et les rotamases**

La figure modélise les différentes interactions entre les rotamases, HSP90, VAP-A, VAP-B et les protéines virales avec lesquelles elles interagissent. Tiré de (Bode et al., 2009)

Des évidences de régulation de FKBP8 par EGLN1 sont disponible dans la littérature, mais seulement dans un contexte de réponse à un stress hypoxique (Barth et al., 2007). Pour comprendre comment cette interaction est régulée dans le contexte de la réplication virale et comment il peut être intégré au modèle actuel reste à déterminer dans de futures expériences.

L'étude d'interaction avec NS3/4A a identifié plusieurs interacteurs liés au transport cellulaire. De celles-là, 3 possèdent le site consensus de clivage ((D/E)X<sub>4</sub>(C/T)↓(S/A) (Grakoui et al., 1993; Zhang et al., 1997)) par l'activité protéase de NS3/4A. Il serait donc intéressant de voir si ces protéines sont clivées, compromettant ainsi leur fonction et la réplication du virus.

### 3.4 CONCLUSION

Ce projet de recherche portait sur la découverte et la caractérisation d'interactions entre l'hôte et le VHC, une infection virale touchant près de 200 millions de personnes mondialement et responsable de nombreux cas de cirrhose du foie et de carcinome hépatiques. Mes travaux ont permis d'identifier de nouveaux interactants des protéines virales Core, NS2, NS3/4A, NS4B, NS5A et NS5B, et d'en étudier le rôle lors de la réplication virale.

Une approche par immunoprécipitation couplée à une détection MS/MS a permis de découvrir de nouvelles interactions grâce à l'expertise dans le laboratoire et à une collaboration avec le laboratoire de Dr. Pierre Thibault. Près d'une centaine de nouvelles interactions ont été découvertes, et six d'entre elles furent confirmées par immunoprécipitation suivie d'une détection par western blot. Le recouvrement de notre étude avec la littérature démontre la force de l'approche.

Ensuite, l'implication fonctionnelle de ces interactions fut démontrée. Un mini-criblage génomique, ciblant les hits de l'approche protéomique, a permis de discerner les interactions importantes pour la réplication du VHC.

L'intégration de ces résultats dans le bassin de connaissance disponible ajoute à une compréhension globale de l'infectome viral. Étant donné le taux de mutation élevé du VHC, une approche thérapeutique ciblant l'hôte est une option intéressante dans le traitement de l'infection, et les connaissances apportées par ce projet de recherche constituent un pas dans la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

## BIBLIOGRAPHIE

1999. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *Journal of viral hepatitis*. 6:35-47.
2004. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *Journal of clinical pharmacology*. 44:20-29.
- Alter, M.J. 2007. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology : WJG*. 13:2436-2441.
- Andre, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J.L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Brechot, G. Paranhos-Baccala, and V. Lotteau. 2002. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *Journal of virology*. 76:6919-6928.
- Bader, G.D., I. Donaldson, C. Wolting, B.F. Ouellette, T. Pawson, and C.W. Hogue. 2001. BIND--The Biomolecular Interaction Network Database. *Nucleic acids research*. 29:242-245.
- Bailon, P., A. Palleroni, C.A. Schaffer, C.L. Spence, W.J. Fung, J.E. Porter, G.K. Ehrlich, W. Pan, Z.X. Xu, M.W. Modi, A. Farid, W. Berthold, and M. Graves. 2001. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjugate chemistry*. 12:195-202.
- Bartenschlager, R., M. Frese, and T. Pietschmann. 2004. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Advances in virus research*. 63:71-180.
- Bartenschlager, R., and T. Pietschmann. 2005. Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:9739-9740.
- Barth, H., C. Schafer, M.I. Adah, F. Zhang, R.J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T.H. Van Kuppevelt, E. Depla, F. Von Weizsacker, H.E. Blum, and T.F. Baumert. 2003. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *The Journal of biological chemistry*. 278:41003-41012.
- Barth, S., J. Nesper, P.A. Hasgall, R. Wirthner, K.J. Nytko, F. Edlich, D.M. Katschinski, D.P. Stiehl, R.H. Wenger, and G. Camenisch. 2007. The peptidyl prolyl cis/trans isomerase FKBP38 determines hypoxia-inducible transcription factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein stability. *Molecular and cellular biology*. 27:3758-3768.

- Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *The Journal of experimental medicine*. 197:633-642.
- Berger, K.L., S.M. Kelly, T.X. Jordan, M.A. Tartell, and G. Randall. 2011. Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication. *Journal of virology*. 85:8870-8883.
- Bianco, A., V. Reghellin, L. Donnici, S. Fenu, R. Alvarez, C. Baruffa, F. Peri, M. Pagani, S. Abrignani, P. Neddermann, and R. De Francesco. 2012. Metabolism of phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha-dependent PI4P is subverted by HCV and is targeted by a 4-anilino quinazoline with antiviral activity. *PLoS pathogens*. 8:e1002576.
- Bissig, K.D., S.F. Wieland, P. Tran, M. Isogawa, T.T. Le, F.V. Chisari, and I.M. Verma. 2010. Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *The Journal of clinical investigation*. 120:924-930.
- Bitzegeio, J., D. Bankwitz, K. Hueging, S. Haid, C. Brohm, M.B. Zeisel, E. Herrmann, M. Iken, M. Ott, T.F. Baumert, and T. Pietschmann. 2010. Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors. *PLoS pathogens*. 6:e1000978.
- Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski, and Y. Rouille. 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology*. 80:6964-6972.
- Bode, J.G., E.D. Brenndorfer, J. Karthe, and D. Haussinger. 2009. Interplay between host cell and hepatitis C virus in regulating viral replication. *Biological chemistry*. 390:1013-1032.
- Borawski, J., P. Troke, X. Puyang, V. Gibaja, S. Zhao, C. Mickanin, J. Leighton-Davies, C.J. Wilson, V. Myer, I. Cornellataracido, J. Baryza, J. Tallarico, G. Joberty, M. Bantscheff, M. Schirle, T. Bouwmeester, J.E. Mathy, K. Lin, T. Compton, M. Labow, B. Wiedmann, and L.A. Gaither. 2009. Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *Journal of virology*. 83:10058-10074.
- Bose, S., M. Mathur, P. Bates, N. Joshi, and A.K. Banerjee. 2003. Requirement for cyclophilin A for the replication of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype. *The Journal of general virology*. 84:1687-1699.
- Boson, B., O. Granio, R. Bartenschlager, and F.L. Cosset. 2011. A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly. *PLoS pathogens*. 7:e1002144.

- Boulant, S., R. Montserret, R.G. Hope, M. Ratniner, P. Targett-Adams, J.P. Lavergne, F. Penin, and J. McLauchlan. 2006. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The Journal of biological chemistry*. 281:22236-22247.
- Bradley, D., K. McCaustland, K. Krawczynski, J. Spelbring, C. Humphrey, and E.H. Cook. 1991. Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *Journal of medical virology*. 34:206-208.
- Bradley, D.W. 1985. The agents of non-A, non-B viral hepatitis. *Journal of virological methods*. 10:307-319.
- Branch, A.D., D.D. Stump, J.A. Gutierrez, F. Eng, and J.L. Walewski. 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. *Seminars in liver disease*. 25:105-117.
- Bukh, J., R.H. Miller, and R.H. Purcell. 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Seminars in liver disease*. 15:41-63.
- Carrere-Kremer, S., C. Montpellier-Pala, L. Cocquerel, C. Wychowski, F. Penin, and J. Dubuisson. 2002. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *Journal of virology*. 76:3720-3730.
- Caruthers, J.M., and D.B. McKay. 2002. Helicase structure and mechanism. *Current opinion in structural biology*. 12:123-133.
- Castro, A.P., T.M. Carvalho, N. Moussatche, and C.R. Damaso. 2003. Redistribution of cyclophilin A to viral factories during vaccinia virus infection and its incorporation into mature particles. *Journal of virology*. 77:9052-9068.
- Catanese, M.T., H. Ansuini, R. Graziani, T. Huby, M. Moreau, J.K. Ball, G. Paonessa, C.M. Rice, R. Cortese, A. Vitelli, and A. Nicosia. 2010. Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants. *Journal of virology*. 84:34-43.
- Catanese, M.T., R. Graziani, T. von Hahn, M. Moreau, T. Huby, G. Paonessa, C. Santini, A. Luzzago, C.M. Rice, R. Cortese, A. Vitelli, and A. Nicosia. 2007. High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *Journal of virology*. 81:8063-8071.
- Ceol, A., A. Chatr Aryamontri, L. Licata, D. Peluso, L. Briganti, L. Perfetto, L. Castagnoli, and G. Cesareni. 2010. MINT, the molecular interaction database: 2009 update. *Nucleic acids research*. 38:D532-539.
- Chang, J., J.T. Guo, D. Jiang, H. Guo, J.M. Taylor, and T.M. Block. 2008. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *Journal of virology*. 82:8215-8223.

- Chang, S.C., J.H. Yen, H.Y. Kang, M.H. Jang, and M.F. Chang. 1994. Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus. *Biochemical and biophysical research communications*. 205:1284-1290.
- Chatel-Chaix, L., M.A. Germain, M. Gotte, and D. Lamarre. 2012. Direct-acting and host-targeting HCV inhibitors: current and future directions. *Current opinion in virology*. 2:588-598.
- Chatel-Chaix, L., P. Melancon, M.E. Racine, M. Baril, and D. Lamarre. 2011. Y-box-binding protein 1 interacts with hepatitis C virus NS3/4A and influences the equilibrium between viral RNA replication and infectious particle production. *Journal of virology*. 85:11022-11037.
- Chatterji, U., M. Bobardt, S. Selvarajah, F. Yang, H. Tang, N. Sakamoto, G. Vuagniaux, T. Parkinson, and P. Gallay. 2009. The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication. *The Journal of biological chemistry*. 284:16998-17005.
- Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 244:359-362.
- CM, F., M. MA, M. J, D. U, and B. LA. 2005. Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, London.
- Colina, R., D. Casane, S. Vasquez, L. Garcia-Aguirre, A. Chunga, H. Romero, B. Khan, and J. Cristina. 2004. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *The Journal of general virology*. 85:31-37.
- Counihan, N.A., S.M. Rawlinson, and B.D. Lindenbach. 2011. Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS pathogens*. 7:e1002302.
- Crabbe, R., G. Vuagniaux, J.M. Dumont, V. Nicolas-Metral, J. Marfurt, and L. Novaroli. 2009. An evaluation of the cyclophilin inhibitor Debio 025 and its potential as a treatment for chronic hepatitis C. *Expert opinion on investigational drugs*. 18:211-220.
- Cuevas, J.M., F. Gonzalez-Candelas, A. Moya, and R. Sanjuan. 2009. Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus in vivo. *Journal of virology*. 83:5760-5764.
- Da Costa, D., M. Turek, D.J. Felmlee, E. Girardi, S. Pfeffer, G. Long, R. Bartenschlager, M.B. Zeisel, and T.F. Baumert. 2012. Reconstitution of the entire hepatitis C virus life cycle in nonhepatic cells. *Journal of virology*. 86:11919-11925.
- de Chasse, B., V. Navratil, L. Tafforeau, M.S. Hiet, A. Aublin-Gex, S. Agaue, G. Meiffren, F. Pradezynski, B.F. Faria, T. Chantier, M. Le Breton, J. Pellet, N. Davoust, P.E. Mangeot, A. Chaboud, F. Penin, Y. Jacob, P.O. Vidalain, M. Vidal, P. Andre, C. Rabourdin-Combe, and V. Lotteau. 2008. Hepatitis C virus infection protein network. *Molecular systems biology*. 4:230.

- Dennis, G., Jr., B.T. Sherman, D.A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H.C. Lane, and R.A. Lempicki. 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome biology*. 4:P3.
- Duffy, S., L.A. Shackelton, and E.C. Holmes. 2008. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature reviews. Genetics*. 9:267-276.
- Dustin, L.B., and C.M. Rice. 2007. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annual review of immunology*. 25:71-99.
- Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H.E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of virology*. 76:5974-5984.
- Einav, S., D. Gerber, P.D. Bryson, E.H. Sklan, M. Elazar, S.J. Maerkl, J.S. Glenn, and S.R. Quake. 2008. Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nature biotechnology*. 26:1019-1027.
- Evans, M.J., C.M. Rice, and S.P. Goff. 2004. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:13038-13043.
- Evans, M.J., T. von Hahn, D.M. Tscherne, A.J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J.A. McKeating, P.D. Bieniasz, and C.M. Rice. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. 446:801-805.
- Farci, P., A. Shimoda, D. Wong, T. Cabezon, D. De Gioannis, A. Strazzera, Y. Shimizu, M. Shapiro, H.J. Alter, and R.H. Purcell. 1996. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:15394-15399.
- Feinstone, S.M., A.Z. Kapikian, R.H. Purcell, H.J. Alter, and P.V. Holland. 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *The New England journal of medicine*. 292:767-770.
- Flisiak, R., J. Jaroszewicz, I. Flisiak, and T. Lapinski. 2012. Update on alisporivir in treatment of viral hepatitis C. *Expert opinion on investigational drugs*. 21:375-382.
- Foster, T.L., P. Gallay, N.J. Stonehouse, and M. Harris. 2011. Cyclophilin A interacts with domain II of hepatitis C virus NS5A and stimulates RNA binding in an isomerase-dependent manner. *Journal of virology*. 85:7460-7464.
- Friebe, P., and R. Bartenschlager. 2002. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *Journal of virology*. 76:5326-5338.



- Friebe, P., J. Boudet, J.P. Simorre, and R. Bartenschlager. 2005. Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *Journal of virology*. 79:380-392.
- Friebe, P., V. Lohmann, N. Krieger, and R. Bartenschlager. 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *Journal of virology*. 75:12047-12057.
- Fried, M.W. 2002. Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology*. 36:S237-244.
- Fried, M.W., M.L. Shiffman, K.R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F.L. Goncalves, Jr., D. Haussinger, M. Diago, G. Carosi, D. Dhumeaux, A. Craxi, A. Lin, J. Hoffman, and J. Yu. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*. 347:975-982.
- Gale, M., Jr., and E.M. Foy. 2005. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*. 436:939-945.
- Gao, L., H. Aizaki, J.W. He, and M.M. Lai. 2004. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of virology*. 78:3480-3488.
- Gao, M., R.E. Nettles, M. Belema, L.B. Snyder, V.N. Nguyen, R.A. Fridell, M.H. Serrano-Wu, D.R. Langley, J.H. Sun, D.R. O'Boyle, 2nd, J.A. Lemm, C. Wang, J.O. Knipe, C. Chien, R.J. Colonno, D.M. Grasela, N.A. Meanwell, and L.G. Hamann. 2010. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature*. 465:96-100.
- Gastaminza, P., G. Cheng, S. Wieland, J. Zhong, W. Liao, and F.V. Chisari. 2008. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *Journal of virology*. 82:2120-2129.
- Grakoui, A., D.W. McCourt, C. Wychowski, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 1993. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *Journal of virology*. 67:2832-2843.
- Griffin, S., C. Stgelais, A.M. Owsianka, A.H. Patel, D. Rowlands, and M. Harris. 2008. Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel. *Hepatology*. 48:1779-1790.
- Griffin, S.D., L.P. Beales, D.S. Clarke, O. Worsfold, S.D. Evans, J. Jaeger, M.P. Harris, and D.J. Rowlands. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS letters*. 535:34-38.
- Hamamoto, I., Y. Nishimura, T. Okamoto, H. Aizaki, M. Liu, Y. Mori, T. Abe, T. Suzuki, M.M. Lai, T. Miyamura, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2005. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *Journal of virology*. 79:13473-13482.

- Henke, J.I., D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C.G. Schuttler, C. Fehr, C. Junemann, and M. Niepmann. 2008. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO journal*. 27:3300-3310.
- Herker, E., C. Harris, C. Hernandez, A. Carpentier, K. Kaehlcke, A.R. Rosenberg, R.V. Farese, Jr., and M. Ott. 2010. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nature medicine*. 16:1295-1298.
- Hijikata, M., Y.K. Shimizu, H. Kato, A. Iwamoto, J.W. Shih, H.J. Alter, R.H. Purcell, and H. Yoshikura. 1993. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *Journal of virology*. 67:1953-1958.
- Hinrichsen, H., Y. Benhamou, H. Wedemeyer, M. Reiser, R.E. Sentjens, J.L. Calleja, X. Forns, A. Erhardt, J. Cronlein, R.L. Chaves, C.L. Yong, G. Nehmiz, and G.G. Steinmann. 2004. Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology*. 127:1347-1355.
- Hoofnagle, J.H. 1997. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology*. 26:15S-20S.
- Houghton, M. 2009. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *Journal of hepatology*. 51:939-948.
- Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C.M. Rice, and J.A. McKeating. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:7271-7276.
- Huang, H., F. Sun, D.M. Owen, W. Li, Y. Chen, M. Gale, Jr., and J. Ye. 2007. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:5848-5853.
- Jiang, J., and G. Luo. 2009. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *Journal of virology*. 83:12680-12691.
- Jirasko, V., R. Montserret, J.Y. Lee, J. Gouttenoire, D. Moradpour, F. Penin, and R. Bartenschlager. 2010. Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS pathogens*. 6:e1001233.
- Jones, C.T., M.T. Catanese, L.M. Law, S.R. Khetani, A.J. Syder, A. Ploss, T.S. Oh, J.W. Schoggins, M.R. MacDonald, S.N. Bhatia, and C.M. Rice. 2010. Real-time imaging of hepatitis C virus infection using a fluorescent cell-based reporter system. *Nature biotechnology*. 28:167-171.
- Jopling, C.L., M. Yi, A.M. Lancaster, S.M. Lemon, and P. Sarnow. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 309:1577-1581.

- Joyce, M.A., and D.L. Tyrrell. 2010. The cell biology of hepatitis C virus. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 12:263-271.
- Kalinina, O., H. Norder, and L.O. Magnius. 2004. Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St Petersburg: proposed mechanism for its formation. *The Journal of general virology*. 85:1853-1857.
- Kato, N., Y. Ootsuyama, S. Ohkoshi, T. Nakazawa, H. Sekiya, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 1992. Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochemical and biophysical research communications*. 189:119-127.
- Kerrien, S., B. Aranda, L. Breuza, A. Bridge, F. Broackes-Carter, C. Chen, M. Duesbury, M. Dumousseau, M. Feuermann, U. Hinz, C. Jandrasits, R.C. Jimenez, J. Khadake, U. Mahadevan, P. Masson, I. Pedruzzi, E. Pfeiffenberger, P. Porras, A. Raghunath, B. Roechert, S. Orchard, and H. Hermjakob. 2012. The IntAct molecular interaction database in 2012. *Nucleic acids research*. 40:D841-846.
- Kiiver, K., A. Merits, M. Ustav, and E. Zusinaite. 2006. Complex formation between hepatitis C virus NS2 and NS3 proteins. *Virus research*. 117:264-272.
- Klein, K.C., S.R. Dellos, and J.R. Lingappa. 2005. Identification of residues in the hepatitis C virus core protein that are critical for capsid assembly in a cell-free system. *Journal of virology*. 79:6814-6826.
- Koch, J.O., V. Lohmann, U. Herian, and R. Bartenschlager. 1996. In vitro studies on the activation of the hepatitis C virus NS3 proteinase by the NS4A cofactor. *Virology*. 221:54-66.
- Kolykhalov, A.A., K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 2000. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *Journal of virology*. 74:2046-2051.
- Koutsoudakis, G., A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager. 2006. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *Journal of virology*. 80:5308-5320.
- Krieger, S.E., M.B. Zeisel, C. Davis, C. Thumann, H.J. Harris, E.K. Schnober, C. Mee, E. Soulier, C. Royer, M. Lambotin, F. Grunert, V.L. Dao Thi, M. Dreux, F.L. Cosset, J.A. McKeating, C. Schuster, and T.F. Baumert. 2010. Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology*. 51:1144-1157.
- Kwofie, S.K., U. Schaefer, V.S. Sundararajan, V.B. Bajic, and A. Christoffels. 2011. HCVpro: hepatitis C virus protein interaction database. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 11:1971-1977.

- Lamarre, D., P.C. Anderson, M. Bailey, P. Beaulieu, G. Bolger, P. Bonneau, M. Bos, D.R. Cameron, M. Cartier, M.G. Cordingley, A.M. Faucher, N. Goudreau, S.H. Kawai, G. Kukolj, L. Lagace, S.R. LaPlante, H. Narjes, M.A. Poupert, J. Rancourt, R.E. Sentjens, R. St George, B. Simoneau, G. Steinmann, D. Thibeault, Y.S. Tsantrizos, S.M. Weldon, C.L. Yong, and M. Llinas-Brunet. 2003. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*. 426:186-189.
- Lanford, R.E., E.S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M.E. Munk, S. Kauppinen, and H. Orum. 2010. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. 327:198-201.
- Lavanchy, D. 2009. The global burden of hepatitis C. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 29 Suppl 1:74-81.
- Lee, K.J., J. Choi, J.H. Ou, and M.M. Lai. 2004. The C-terminal transmembrane domain of hepatitis C virus (HCV) RNA polymerase is essential for HCV replication in vivo. *Journal of virology*. 78:3797-3802.
- Lesburg, C.A., M.B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A.F. Mannarino, and P.C. Weber. 1999. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nature structural biology*. 6:937-943.
- Li, K., E. Foy, J.C. Ferreon, M. Nakamura, A.C. Ferreon, M. Ikeda, S.C. Ray, M. Gale, Jr., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:2992-2997.
- Li, Q., A.L. Brass, A. Ng, Z. Hu, R.J. Xavier, T.J. Liang, and S.J. Elledge. 2009. A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:16410-16415.
- Lin, W., S.S. Kim, E. Yeung, Y. Kamegaya, J.T. Blackard, K.A. Kim, M.J. Holtzman, and R.T. Chung. 2006. Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. *Journal of virology*. 80:9226-9235.
- Lindenbach, B.D., P. Meuleman, A. Ploss, T. Vanwolleghem, A.J. Syder, J.A. McKeating, R.E. Lanford, S.M. Feinstone, M.E. Major, G. Leroux-Roels, and C.M. Rice. 2006. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:3805-3809.
- Lindenbach, B.D., H.-J. Thiel, and C.M. Rice. 2007. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *In* Fields Virology. Vol. 1. D.M.K.a.P.M. Howley, editor. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1101-1152.

- Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 285:110-113.
- Loo, Y.M., D.M. Owen, K. Li, A.K. Erickson, C.L. Johnson, P.M. Fish, D.S. Carney, T. Wang, H. Ishida, M. Yoneyama, T. Fujita, T. Saito, W.M. Lee, C.H. Hagedorn, D.T. Lau, S.A. Weinman, S.M. Lemon, and M. Gale, Jr. 2006. Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:6001-6006.
- Lupberger, J., M.B. Zeisel, F. Xiao, C. Thumann, I. Fofana, L. Zona, C. Davis, C.J. Mee, M. Turek, S. Gorke, C. Royer, B. Fischer, M.N. Zahid, D. Lavillette, J. Fresquet, F.L. Cosset, S.M. Rothenberg, T. Pietschmann, A.H. Patel, P. Pessaux, M. Doffoel, W. Raffelsberger, O. Poch, J.A. McKeating, L. Brino, and T.F. Baumert. 2011. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nature medicine*. 17:589-595.
- Ma, Y., M. Anantpadma, J.M. Timpe, S. Shanmugam, S.M. Singh, S.M. Lemon, and M. Yi. 2011. Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *Journal of virology*. 85:86-97.
- Manns, M.P., J.G. McHutchison, S.C. Gordon, V.K. Rustgi, M. Shiffman, R. Reindollar, Z.D. Goodman, K. Koury, M. Ling, and J.K. Albrecht. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 358:958-965.
- Masaki, T., R. Suzuki, K. Murakami, H. Aizaki, K. Ishii, A. Murayama, T. Date, Y. Matsuura, T. Miyamura, T. Wakita, and T. Suzuki. 2008. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *Journal of virology*. 82:7964-7976.
- Matto, M., C.M. Rice, B. Aroeti, and J.S. Glenn. 2004. Hepatitis C virus core protein associates with detergent-resistant membranes distinct from classical plasma membrane rafts. *Journal of virology*. 78:12047-12053.
- McHutchison, J.G., S.C. Gordon, E.R. Schiff, M.L. Shiffman, W.M. Lee, V.K. Rustgi, Z.D. Goodman, M.H. Ling, S. Cort, and J.K. Albrecht. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *The New England journal of medicine*. 339:1485-1492.
- McLauchlan, J. 2000. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *Journal of viral hepatitis*. 7:2-14.
- McLauchlan, J., M.K. Lemberg, G. Hope, and B. Martoglio. 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The EMBO journal*. 21:3980-3988.

- McMullan, L.K., A. Grakoui, M.J. Evans, K. Mihalik, M. Puig, A.D. Branch, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 2007. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:2879-2884.
- Meertens, L., C. Bertaux, L. Cukierman, E. Cormier, D. Lavillette, F.L. Cosset, and T. Dragic. 2008. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *Journal of virology*. 82:3555-3560.
- Mellor, J., E.C. Holmes, L.M. Jarvis, P.L. Yap, and P. Simmonds. 1995. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *The Journal of general virology*. 76 ( Pt 10):2493-2507.
- Mercer, D.F., D.E. Schiller, J.F. Elliott, D.N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, W.R. Addison, K.P. Fischer, T.A. Churchill, J.R. Lakey, D.L. Tyrrell, and N.M. Kneteman. 2001. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature medicine*. 7:927-933.
- Meunier, J.C., R.E. Engle, K. Faulk, M. Zhao, B. Bartosch, H. Alter, S.U. Emerson, F.L. Cosset, R.H. Purcell, and J. Bukh. 2005. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:4560-4565.
- Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and J. Tschopp. 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*. 437:1167-1172.
- Meyniel-Schicklin, L., B. de Chasse, P. Andre, and V. Lotteau. 2012. Viruses and interactomes in translation. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 11:M111 014738.
- Miyazawa, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature cell biology*. 9:1089-1097.
- Miyazawa, Y., M. Hijikata, M. Yamaji, M. Hosaka, H. Takahashi, and K. Shimotohno. 2003. Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *The Journal of biological chemistry*. 278:50301-50308.
- Monazahian, M., I. Bohme, S. Bonk, A. Koch, C. Scholz, S. Grethe, and R. Thomssen. 1999. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *Journal of medical virology*. 57:223-229.
- Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews. Microbiology*. 5:453-463.
- Moriishi, K., and Y. Matsuura. 2012. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Frontiers in microbiology*. 3:54.

- N. E. Wilsher, S.S.-B., M. Carr, G. Chessari, E. Chiarparin, J. Coyle, L. Fazal, B. Graham, C. Hamlett, S. Hiscock, M. Hodder, H. Jhoti., A. Millemaggi, C. Murray, D. Norton, P. Pathuri, M. Reader, D. Rees, S. Rich, M. Sanders, N. Thompson, H. Willems, P. A. Williams, A. Woodhead. 2012. Preclinical characterisation of a novel allosteric inhibitor of the HCV full length NS3/4a protein. *In* 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Vol. Abstract 878, Barcelona, Spain.
- Navratil, V., B. de Chasse, L. Meyniel, S. Delmotte, C. Gautier, P. Andre, V. Lotteau, and C. Rabourdin-Combe. 2009. VirHostNet: a knowledge base for the management and the analysis of proteome-wide virus-host interaction networks. *Nucleic acids research*. 37:D661-668.
- Navratil, V., V. Lotteau, and C. Rabourdin-Combe. 2010. [The virtual infected cell: a systems biology rational for antiviral drug discovery]. *Medicine sciences : M/S*. 26:603-609.
- Neumann, A.U., N.P. Lam, H. Dahari, D.R. Gretch, T.E. Wiley, T.J. Layden, and A.S. Perelson. 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*. 282:103-107.
- Ng, T.I., H. Mo, T. Pilot-Matias, Y. He, G. Koev, P. Krishnan, R. Mondal, R. Pithawalla, W. He, T. Dekhtyar, J. Packer, M. Schurdak, and A. Molla. 2007. Identification of host genes involved in hepatitis C virus replication by small interfering RNA technology. *Hepatology*. 45:1413-1421.
- Nyanguile, O., B. Devogelaere, L. Vijgen, W. Van den Broeck, F. Pauwels, M.D. Cummings, H.L. De Bondt, A.M. Vos, J.M. Berke, O. Lenz, G. Vandercruyssen, K. Vermeiren, W. Mostmans, P. Dehertogh, F. Delouvroy, S. Vendeville, K. VanDyck, K. Dockx, E. Cleiren, P. Raboisson, K.A. Simmen, and G.C. Fanning. 2010. 1a/1b subtype profiling of nonnucleoside polymerase inhibitors of hepatitis C virus. *Journal of virology*. 84:2923-2934.
- Okamoto, T., Y. Nishimura, T. Ichimura, K. Suzuki, T. Miyamura, T. Suzuki, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2006. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *The EMBO journal*. 25:5015-5025.
- Otto, G.A., and J.D. Puglisi. 2004. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell*. 119:369-380.
- Peng, L., D. Liang, W. Tong, J. Li, and Z. Yuan. 2010. Hepatitis C virus NS5A activates the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, contributing to cell survival by disrupting the interaction between FK506-binding protein 38 (FKBP38) and mTOR. *The Journal of biological chemistry*. 285:20870-20881.
- Pestka, J.M., M.B. Zeisel, E. Blaser, P. Schurmann, B. Bartosch, F.L. Cosset, A.H. Patel, H. Meisel, J. Baumert, S. Viazov, K. Rispeter, H.E. Blum, M. Roggendorf, and T.F. Baumert. 2007. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:6025-6030.

- Phan, T., R.K. Beran, C. Peters, I.C. Lorenz, and B.D. Lindenbach. 2009. Hepatitis C virus NS2 protein contributes to virus particle assembly via opposing epistatic interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *Journal of virology*. 83:8379-8395.
- Pirkl, F., and J. Buchner. 2001. Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *Journal of molecular biology*. 308:795-806.
- Ploss, A., and M.J. Evans. 2012. Hepatitis C virus host cell entry. *Current opinion in virology*. 2:14-19.
- Popescu, C.I., N. Callens, D. Trinel, P. Roingeard, D. Moradpour, V. Descamps, G. Duverlie, F. Penin, L. Heliot, Y. Rouille, and J. Dubuisson. 2011. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS pathogens*. 7:e1001278.
- Poynard, T., P. Marcellin, S.S. Lee, C. Niederau, G.S. Minuk, G. Ideo, V. Bain, J. Heathcote, S. Zeuzem, C. Trepo, and J. Albrecht. 1998. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet*. 352:1426-1432.
- Quintavalle, M., S. Sambucini, C. Di Pietro, R. De Francesco, and P. Neddermann. 2006. The alpha isoform of protein kinase CKI is responsible for hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation. *Journal of virology*. 80:11305-11312.
- Randall, G., M. Panis, J.D. Cooper, T.L. Tellinghuisen, K.E. Sukhodolets, S. Pfeffer, M. Landthaler, P. Landgraf, S. Kan, B.D. Lindenbach, M. Chien, D.B. Weir, J.J. Russo, J. Ju, M.J. Brownstein, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl, and C.M. Rice. 2007. Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:12884-12889.
- Reed, K.E., A.E. Gorbalenya, and C.M. Rice. 1998. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *Journal of virology*. 72:6199-6206.
- Reed, W., J. Carroll, and A. Agramonte. 2001. The etiology of yellow fever: an additional note . 1901. *Military medicine*. 166:44-53.
- Reichard, O., G. Norkrans, A. Fryden, J.H. Braconier, A. Sonnerborg, and O. Weiland. 1998. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of interferon alpha-2b with and without ribavirin for chronic hepatitis C. The Swedish Study Group. *Lancet*. 351:83-87.
- Reiss, S., I. Rebhan, P. Backes, I. Romero-Brey, H. Erfle, P. Matula, L. Kaderali, M. Poenisch, H. Blankenburg, M.S. Hiet, T. Longerich, S. Diehl, F. Ramirez, T. Balla, K.



- Rohr, A. Kaul, S. Buhler, R. Pepperkok, T. Lengauer, M. Albrecht, R. Eils, P. Schirmacher, V. Lohmann, and R. Bartenschlager. 2011. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell host & microbe*. 9:32-45.
- Rong, L., H. Dahari, R.M. Ribeiro, and A.S. Perelson. 2010. Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. *Science translational medicine*. 2:30ra32.
- Sakai, A., M.S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S.U. Emerson, R.H. Purcell, and J. Bukh. 2003. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:11646-11651.
- Santolini, E., G. Migliaccio, and N. La Monica. 1994. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *Journal of virology*. 68:3631-3641.
- Sarrazin, C., C. Hezode, S. Zeuzem, and J.M. Pawlotsky. 2012. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology*. 56 Suppl 1:S88-100.
- Scheel, T.K., J.M. Gottwein, T.B. Jensen, J.C. Prentoe, A.M. Hoegh, H.J. Alter, J. Eugen-Olsen, and J. Bukh. 2008. Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:997-1002.
- Schmidt, A., H. Wu, R.E. MacKenzie, V.J. Chen, J.R. Bewly, J.E. Ray, J.E. Toth, and M. Cygler. 2000. Structures of three inhibitor complexes provide insight into the reaction mechanism of the human methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase. *Biochemistry*. 39:6325-6335.
- Schwartz, M., J. Chen, M. Janda, M. Sullivan, J. den Boon, and P. Ahlquist. 2002. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Molecular cell*. 9:505-514.
- Schwer, B., S. Ren, T. Pietschmann, J. Kartenbeck, K. Kaehlcke, R. Bartenschlager, T.S. Yen, and M. Ott. 2004. Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *Journal of virology*. 78:7958-7968.
- Selby, M.J., E. Glazer, F. Masiarz, and M. Houghton. 1994. Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. *Virology*. 204:114-122.
- Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D.G. Murphy, H. Okamoto, J.M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I.T. Shin, L.J. Stuyver, H.J. Thiel, S. Viazov, A.J. Weiner, and A. Widell. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 42:962-973.

- Stapleford, K.A., and B.D. Lindenbach. 2011. Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *Journal of virology*. 85:1706-1717.
- Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A.H. Patel, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. 2007. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS pathogens*. 3:e103.
- Supekova, L., F. Supek, J. Lee, S. Chen, N. Gray, J.P. Pezacki, A. Schlapbach, and P.G. Schultz. 2008. Identification of human kinases involved in hepatitis C virus replication by small interference RNA library screening. *The Journal of biological chemistry*. 283:29-36.
- Tai, A.W., Y. Benita, L.F. Peng, S.S. Kim, N. Sakamoto, R.J. Xavier, and R.T. Chung. 2009. A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell host & microbe*. 5:298-307.
- Tanaka, T., N. Kato, M.J. Cho, and K. Shimotohno. 1995. A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochemical and biophysical research communications*. 215:744-749.
- Tanaka, T., N. Kato, M.J. Cho, K. Sugiyama, and K. Shimotohno. 1996. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *Journal of virology*. 70:3307-3312.
- Tellinghuisen, T.L., M.J. Evans, T. von Hahn, S. You, and C.M. Rice. 2007. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *Journal of virology*. 81:8853-8867.
- Tellinghuisen, T.L., J. Marcotrigiano, A.E. Gorbalenya, and C.M. Rice. 2004. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *The Journal of biological chemistry*. 279:48576-48587.
- Tellinghuisen, T.L., J. Marcotrigiano, and C.M. Rice. 2005. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature*. 435:374-379.
- Tellinghuisen, T.L., and C.M. Rice. 2002. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Current opinion in microbiology*. 5:419-427.
- Thomssen, R., S. Bonk, C. Propfe, K.H. Heermann, H.G. Kochel, and A. Uy. 1992. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Medical microbiology and immunology*. 181:293-300.
- Tian, Y.M., K.K. Yeoh, M.K. Lee, T. Eriksson, B.M. Kessler, H.B. Kramer, M.J. Edelmann, C. Willam, C.W. Pugh, C.J. Schofield, and P.J. Ratcliffe. 2011. Differential sensitivity of hypoxia inducible factor hydroxylation sites to hypoxia and hydroxylase inhibitors. *The Journal of biological chemistry*. 286:13041-13051.
- Towers, G.J. 2007. The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology*. 4:40.

- Tripathi, L.P., C. Kataoka, S. Taguwa, K. Moriishi, Y. Mori, Y. Matsuura, and K. Mizuguchi. 2010. Network based analysis of hepatitis C virus core and NS4B protein interactions. *Molecular bioSystems*. 6:2539-2553.
- Trotard, M., C. Lepere-Douard, M. Regeard, C. Piquet-Pellorce, D. Lavillette, F.L. Cosset, P. Gripon, and J. Le Seyec. 2009. Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 23:3780-3789.
- Tscherne, D.M., C.T. Jones, M.J. Evans, B.D. Lindenbach, J.A. McKeating, and C.M. Rice. 2006. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *Journal of virology*. 80:1734-1741.
- Tu, H., L. Gao, S.T. Shi, D.R. Taylor, T. Yang, A.K. Mircheff, Y. Wen, A.E. Gorbalenya, S.B. Hwang, and M.M. Lai. 1999. Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology*. 263:30-41.
- Vaillancourt, F.H., M. Brault, L. Pilote, N. Uyttensprot, E.T. Gaillard, J.H. Stoltz, B.L. Knight, L. Pantages, M. McFarland, S. Breitfelder, T.T. Chiu, L. Mahrouche, A.M. Faucher, M. Cartier, M.G. Cordingley, R.C. Bethell, H. Jiang, P.W. White, and G. Kukulj. 2012. Evaluation of Phosphatidylinositol-4-Kinase IIIalpha as a Hepatitis C Virus Drug Target. *Journal of virology*. 86:11595-11607.
- Vaillancourt, F.H., L. Pilote, M. Cartier, J. Lippens, M. Liuzzi, R.C. Bethell, M.G. Cordingley, and G. Kukulj. 2009. Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology*. 387:5-10.
- van Dijk, A.A., E.V. Makeyev, and D.H. Bamford. 2004. Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *The Journal of general virology*. 85:1077-1093.
- Voisset, C., and J. Dubuisson. 2004. Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 96:413-420.
- Vrolijk, J.M., R.J. de Knegt, B.J. Veldt, H. Orlent, and S.W. Schalm. 2004. The treatment of hepatitis C: history, presence and future. *The Netherlands journal of medicine*. 62:76-82.
- Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T.J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine*. 11:791-796.
- Watashi, K., M. Hijikata, M. Hosaka, M. Yamaji, and K. Shimotohno. 2003. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology*. 38:1282-1288.

- Watashi, K., N. Ishii, M. Hijikata, D. Inoue, T. Murata, Y. Miyanari, and K. Shimotohno. 2005. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Molecular cell*. 19:111-122.
- Welbourn, S., R. Green, I. Gamache, S. Dandache, V. Lohmann, R. Bartenschlager, K. Meerovitch, and A. Pause. 2005. Hepatitis C virus NS2/3 processing is required for NS3 stability and viral RNA replication. *The Journal of biological chemistry*. 280:29604-29611.
- Welsch, C., A. Jesudian, S. Zeuzem, and I. Jacobson. 2012. New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut*. 61 Suppl 1:i36-46.
- Wilkin, T.J., and R.M. Gulick. 2012. CCR5 antagonism in HIV infection: current concepts and future opportunities. *Annual review of medicine*. 63:81-93.
- Wolk, B., D. Sansonno, H.G. Krausslich, F. Dammacco, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour. 2000. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of virology*. 74:2293-2304.
- Yagi, Y.I., K. Abe, K. Ikebukuro, and K. Sode. 2009. Kinetic mechanism and inhibitor characterization of WNK1 kinase. *Biochemistry*. 48:10255-10266.
- Yamashita, T., S. Kaneko, Y. Shiota, W. Qin, T. Nomura, K. Kobayashi, and S. Murakami. 1998. RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. *The Journal of biological chemistry*. 273:15479-15486.
- Yang, F., J.M. Robotham, H.B. Nelson, A. Irsigler, R. Kenworthy, and H. Tang. 2008. Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *Journal of virology*. 82:5269-5278.
- You, S., D.D. Stump, A.D. Branch, and C.M. Rice. 2004. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *Journal of virology*. 78:1352-1366.
- Yu, G.Y., K.J. Lee, L. Gao, and M.M. Lai. 2006. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *Journal of virology*. 80:6013-6023.
- Yuasa, T., G. Ishikawa, S. Manabe, S. Sekiguchi, K. Takeuchi, and T. Miyamura. 1991. The particle size of hepatitis C virus estimated by filtration through microporous regenerated cellulose fibre. *The Journal of general virology*. 72 ( Pt 8):2021-2024.
- Zhang, R., J. Durkin, W.T. Windsor, C. McNemar, L. Ramanathan, and H.V. Le. 1997. Probing the substrate specificity of hepatitis C virus NS3 serine protease by using synthetic peptides. *Journal of virology*. 71:6208-6213.

- Zheng, A., F. Yuan, Y. Li, F. Zhu, P. Hou, J. Li, X. Song, M. Ding, and H. Deng. 2007. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *Journal of virology*. 81:12465-12471.
- Zhu, H., F. Wong-Staal, H. Lee, A. Syder, J. McKelvy, R.T. Schooley, and D.L. Wyles. 2012. Evaluation of ITX 5061, a scavenger receptor B1 antagonist: resistance selection and activity in combination with other hepatitis C virus antivirals. *The Journal of infectious diseases*. 205:656-662.
- Zibert, A., H. Meisel, W. Kraas, A. Schulz, G. Jung, and M. Roggendorf. 1997. Early antibody response against hypervariable region 1 is associated with acute self-limiting infections of hepatitis C virus. *Hepatology*. 25:1245-1249.

## **ANNEXE 1- DIRECT-ACTING AND HOST-TARGETING HCV INHIBITORS : CURRENT AND FUTURE DIRECTIONS.**

Cet annexe est une revue de littérature à laquelle j'ai contribué, et constitue de l'information complémentaire à la section 1.8 abordant le sujet des traitement du VHC. Cette revue a été écrite en 2012 et aborde le sujet des études en cours et des avenues thérapeutiques futures concernant le VHC.

# **Direct-acting and host-targeting HCV inhibitors: Current and future directions**

Laurent Chatel-Chaix<sup>1</sup>, Marie-Anne Germain<sup>1</sup>, Mathias Götte<sup>3</sup> and Daniel Lamarre<sup>1,2\*</sup>.

Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC)<sup>1</sup>, Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4<sup>2</sup>; Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, Québec, Canada H3A 2B4<sup>3</sup>.

\*Corresponding author

## **HIGHLIGHTS**

- Direct-acting antivirals (DAA) are currently challenged in HCV infected patients
- Cellular machineries co-opted by HCV represent promising host targeting antivirals (HTA)
- Successful HCV therapies are achieved with all-oral IFN free drug combination
- Future therapy will rely on individualized regimen of various classes of DAA and/or HTA

## **ABSTRACT**

**The inclusion of NS3 protease inhibitors to the interferon-containing standard of care improved sustained viral response rates in hepatitis C virus (HCV) infected patients. However, there is still an unmet medical need as this drug regimen is poorly tolerated and lacks efficacy, especially in difficult-to-treat patients. Intense drug discovery and development efforts have focused on direct-acting antivirals (DAA) that target NS3 protease, NS5B polymerase and the NS5A protein. DAA combinations are currently assessed in clinical trials. Alternative antivirals have emerged that target host machineries co-opted by HCV. Finally, continuous and better understanding of HCV biology allows speculating on the value of novel classes of DAA required in future personalized all-oral interferon-free combination therapy and for supporting global disease eradication.**

## INTRODUCTION

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection represents a major public health concern since almost 200 million individuals worldwide are affected by this disease that leads to progressive fibrosis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma and eventually death [1]. HCV is an enveloped RNA virus from the Hepacivirus genus within the Flaviviridae family. Following HCV entry into hepatocytes, the capsid delivers the 9.6kb viral RNA genome that, under the control of an internal ribosome entry site (IRES), encodes a 3,000 amino acid polyprotein (Figure 1). This product is further processed by viral and cellular proteases into 10 mature structural and non-structural (NS) proteins: core, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B. NS2 cleaves the NS2-NS3 junction while NS3 protease with its co-factor NS4A processes the polyprotein at all downstream sites. NS4B induces the formation of an endoplasmic reticulum (ER)-derived double or multi-membrane vesicle structures called the “membranous web”, which serve as a factory for HCV replication and virions biogenesis within a lipid microenvironment. The NS5B RNA polymerase replicates its genomic RNA with additional viral factors, including the RNA-binding protein NS5A and the helicase domain of NS3. Core multimerizes at the surface of the lipid droplets, a critical cellular organelle involved in the storage of neutral lipids, which serve as a transient platform for virus particle assembly. Capsids then co-opt the very-low density lipoprotein (VLDL) morphogenesis and secretory pathway machineries to egress from the cells. Viral envelope proteins E1 and E2 embed the surface of the virus particle and are responsible for the entry into target cells [2-7].

NS5B is an error prone polymerase. Hence, viral quasi-species co-exist within the liver leading to a high genetic diversity. This heterogeneous repertoire favours the emergence of resistant viruses that escape under host immune- or antiviral-mediated selective pressure [8]. However, unlike infection with the human immunodeficiency virus (HIV), HCV has no latency, the virus can be eradicated from the cells and the patients can be cured.

Until 2011, the only available treatment and standard of care (SOC) consisting in the co-administration of pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin (Peg-IFN/RBV) provided limited efficacy, was poorly tolerated and was not HCV-specific [9,10]. First generation of direct-acting antivirals (DAA) INCIVEK®/Telaprevir (Vertex Pharmaceuticals) and Victrelis®/Boceprevir (Merck & Co) are NS3 protease inhibitors (PI) that were approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for use in the United States in mid-2011 [11,12]. Many antiviral drugs of this class have been developed all directed to the serine protease active site. The sustained viral response (SVR) rates increased from 40 to 70% in well monitored clinical trials and the length of treatment can be shortened in some cases. However, the efficacy of this treatment is not genotype-wide, and several infected individuals respond poorly. Moreover, adverse effects and complicated treatment schedules may lead to poor adherence, and treated patients therefore require close medical attention. This highlights



the persistent unmet medical need encouraging pharmaceuticals companies to continuously put a major effort in developing new classes of potent DAAs that could be used in combination, ideally as part of pan-genotypic Peg-IFN/RBV -free treatments.

## **CURRENT ANTIVIRAL THERAPEUTIC APPROACHES AND STRATEGIES**

New classes of DAAs have been designed and are currently assessed in clinical trials. Advanced compounds target the NS5A regulatory protein and the NS5B polymerase. For instance, the first-in-class NS5A inhibitor Daclatasvir (BMS-790052; Bristol-Myers Squibb) is extremely potent in cell culture (EC<sub>50</sub> in the pM range)[13] and clinical trials are very encouraging [14] although its exact mechanism of action remains elusive. Additionally, Gilead has in its pipeline a very promising nucleoside polymerase inhibitor, GS-7977 whose co-administration with RBV led to a 88% SVR rate 4 weeks following the end of treatment [15].

Despite the high antiviral potency of many of these molecules, clinical data show that the selective pressure imposed by DAA-based monotherapy can lead to the rapid emergence of resistant mutants, which were pre-existing as significant subpopulations prior to treatment. With the success of highly active anti-retroviral treatment (HAART) for HIV infection control [16], industry points to treatment strategies involving the combination of multiple DAAs without overlapping resistance profile in order to achieve durable effects by drug regimens. The proof-of-concept of such strategy was provided by the INFORM-1 study (Roche), which showed that the combination of Danoprevir (PI), the NS5B inhibitor Mericitabine and Peg-IFN/RBV significantly increased SVR rates as compared to Peg-IFN/Rib treatment [17]. Recently, Bristol-Myers Squibb and Gilead reported that an all-oral hepatitis C therapy with co-administration of Daclatasvir and GS-7977 provided a 100% SVR rate 4 weeks in genotype 1-infected patients, challenging the requirement of RBV/IFN for future curative combination therapies [18]. Finally, in phase II clinical trials operated by Gilead assessing for the first time the co-administration of 3 different classes of DAAs (NS3, NS5A and NS5B inhibitors plus Rib), every treated patient achieved SVR [19]. Overall, results from clinical trials are very encouraging and suggest that it should be possible to achieve the ultimate goal of an all-oral DAA-only combination therapy with minor adverse effects (reviewed in Table I). Hence, developing new classes of DAAs with no overlapping resistance profile remains relevant to provide therapeutic options with most appropriate efficacy/risk ratio for a given patient as part of personalized treatment for HCV infection.

## **POTENTIAL NEW CLASSES OF DAAs**

While NS3 PIs INCIVEK® and Victrelis® are now part of an improved treatment of hepatitis C, a myriad of potent inhibitors based on similar mechanism of action are currently assessed in combination (Table I). However, NS3 protein has pleiotropic functions during HCV life cycle notably during RNA replication and particle assembly [20,21]. NS3 possesses an helicase

domain harboring RNA unwinding and ATPase activities, which are essential to RNA replication and hence represent potential targets [22-24]. Despite efforts in the development of NS3 helicase inhibitors [21,25], and progress made in the design of assays suitable for high throughput screening, no such inhibitors are currently evaluated in the clinic. Inhibition specificity and expected toxicity remain a challenge since the motor domain of NS3 helicase is similar to the one of many cellular proteins [26]. On the other hand, the inhibition of other functions of NS3 should be investigated since it also regulates HCV particle production independently of its enzymatic activities and most probably through protein/protein interactions [27]. NS3 helicase and protease domains mutually interact and regulate each other through conformational switches [28-32]. Very interestingly, Astex Pharmaceuticals has designed a novel class of NS3 PI that binds to an allosteric site at the NS3 protease/helicase interface, resulting in the stabilization of an inactive conformation [33]. Nonetheless, new classes of NS3 inhibitors will hopefully emerge in the future.

NS4B represents a potential antiviral target and plays an essential role during HCV life cycle. NS4B induces the membranous web that is critical for the formation of RNA replication complexes within detergent-resistant membrane microdomains where HCV RNA replicates [6]. Clemizole inhibits NS4B RNA-binding activity and RNA replication [34]. This compound has entered phase I CLEAN-1 clinical trials in 2009 (Eiger Biopharmaceuticals) but no results are currently available [35].

While current targeted therapies with DAAs ultimately inhibit viral RNA replication, the late steps of the virus life cycle represent attractive targets for the development of novel classes of DAAs. However, with the lack of a fully infectious cell culture system until recently [36,37], this part of HCV life cycle remains not well understood. P7 protein is a viroporin essential for virus infectivity in chimpanzees and is required for HCV particle assembly in vitro most likely through its cation channel properties [38]. Several P7 inhibitors such as amantadine, rimantadine, hexamethylene amiloride and long alkyl-chain iminosugar derivatives have been identified and are targeting ion channel activity [39-43]. Nevertheless, the sensitivity of P7 to these drugs is genotype-dependent [42] emphasizing that P7 remains difficult to target because of its high degree of sequence variability. P7-targeting compound BIT225, initially developed as a HIV-1 Vpu viroporin inhibitor [44], is currently challenged in phase II clinical trials operated by Biotron. Interim results revealed that 87% of patients treated with BIT225 and Peg-IFN/RBV showed no detectable HCV RNA after 3 months of therapy [45,46]. Such DAA, targeting the late steps of HCV life cycle is expected to select resistance mutations different from NS3, NS5B and NS5A inhibitors.

Another way to target HCV particle production resides in directly inhibiting the assembly of new capsids, a process partly mediated by the multimerization of HCV core at the surface of the lipid droplets. 25-hydroxyvitamin D(3) has been recently shown to inhibit particle

production but the mechanism of action remains elusive and the potency is relatively low [47]. Using in vitro core multimerization assays, assembly inhibitors were identified (SL209 and SL201) with antiviral activities [48-50]. While no core inhibitor is currently challenged in clinical trials, HCV particle assembly remains a very exquisite target for the design of new DAAs that would restrict the dissemination of HCV through the liver.

Finally, numerous studies show that HCV proteins interact together not only during RNA replication but also during particle assembly. Moreover, the spatial and temporal regulation of these interactions may regulate the fine-tuned equilibrium between each step of HCV life cycle [51,52]. Numerous genetic interactions between HCV proteins identified by the selection of compensatory mutations have been reported to increase the efficiency of either process [53-56]. More recently, Jiang et al. have demonstrated that some adaptive mutations enhancing physical interactions between structural and non-structural proteins also promote virus production [52]. Hence, disrupting interaction between viral proteins represent a very interesting avenue for the development of DAAs since viral escape would involve co-evolution of two HCV proteins, hence significantly increasing the genetic barrier to resistance. We have developed a drug discovery platform based on membrane protein-protein interactions (mPPIs) and identified potent small-molecule HCV inhibitors targeting membrane-anchored NS3/4A protein dimer (Lamarre, D. unpublished data). Indeed, inhibitor resistance mutations were observed at multiple positions of viral genome and never reported with existing class of DAAs. This promising lead series represents a novel class of HCV-specific mPPI inhibitors.

## **HOST-TARGETING ANTIVIRALS**

The design of host-targeting antivirals (HTA) represents another challenging field of HCV therapeutics development. HTAs inhibit the function of cellular factors critical for HCV replication. Such approaches are expected to increase the barrier to resistance since host genes are not subjected to the same error-prone NS5B polymerase-mediated mutational process. Although, adaptation of viral factor that interacts with inhibitor-bound host factor generally results in resistance. The major drawback however, resides in the adverse effects expected from the disruption of an important cellular process. Nevertheless, the successful development of HTA for HIV-1 treatment, such as CCR5 co-receptor antagonists [57], also encouraged the pharmaceutical industry to develop HTAs for HCV therapy. The cyclophilin A (CypA) inhibitor, Alisporivir (Deb-025) developed by Novartis is the most clinically advanced HTA. CypA is a host factor critical for HCV replication and is involved in the cis/trans isomerisation of NS5A domains 2 and 3, stimulating NS5A RNA-binding activity [58-61]. CypA/NS5A interaction is disrupted by Alisporivir [61] that possesses a pan-genotypic antiviral potency and low potential for resistance selection [61-63]. Importantly, the Alisporivir/RBV-based IFN-free treatment cured more than 80% of genotype 2/3-infected patients [64]. However, the FDA has recently placed a full clinical hold on the phase III Alisporivir trials because of life-

threatening pancreatitis observed in few patients. Other cyclophilin inhibitors included SCY-635 (Scynexis) and NIM811 (Novartis) in development [65,66]. While the status of Alisporivir clinical development is not officially released, this drug class represents the first proof-of-concept for a HTA-based anti-HCV therapy.

Miravirsen (SPC3649), developed by Santaris Pharma A/S, is a locked nucleic acid phosphorothioate antisense oligonucleotide that inhibits the activity of miR122, a microRNA (miRNA) required for HCV RNA translation [67,68]. While miRNAs generally inhibit the expression of specific genes through the inhibition of translation and/or induction of RNA degradation [69], miR122 harbours non-canonical features specific to HCV. Indeed, miR122 stimulates HCV RNA translation and replication via its hybridization with two sequences within the 5' non-translated region of HCV genomic RNA [70,71]. This is achieved most probably by disrupting ternary interactions between the 5' and 3' ends of HCV RNA and/or by protecting the viral genome from degradation and from innate immune RNA sensors [72]. Targeting miR122 presents several assets since this miRNA122 is liver-specific and targets conserved sequences among HCV genotypes. Following evidence of antiviral activity in primates [67], Miravirsen has entered clinical trials and represents the first-in-class miRNA-targeting drug administered in patients. From phase II trials, proof-of-concept was achieved following 5 weekly doses of Miravirsen. Importantly, there is no evidence of resistance mutation emergence suggesting that HCV is unable to adapt to the pressure imposed by Miravirsen [73]. These results place Miravirsen as a very promising HTA for combination with DAAs to significantly increase the barrier to resistance.

Host machineries hijacked by HCV represent exquisite targets for the development of novel HTAs. Virus entry into the cell relies on an ordered sequential process involving many surface host factors. Glycosaminoglycans [74,75] and low-density lipoprotein receptor (LDLR)[76,77] are responsible for virus initial binding to the cell. Then, scavenger receptor class B type I (SR-BI) [78], tetraspanin CD81 [79], claudin 1, 6 and 9 [80-82] and occludin [83,84] are required for internalization in a clathrin-dependent manner [85]. However, CD81 and SR-BI reside at the apical surface while claudin and occludin localize at the tight junction. It remains unclear how these entry co-factors interact to generate a complex and specific HCV/host interface that efficiently delivers viral genome into target cells. Neutralizing antibodies against viral envelope proteins were an obvious option for viral propagation inhibition, showing efficacy *in vitro* with different genotypes [86,87]. Unfortunately, their efficiency *in vivo* turned out to be much lower [88,89], probably due to an inefficient blockage of cell-to-cell transmission of virus in the liver. Neutralizing antibodies targeting SR-BI were developed and displayed high efficiency in a humanized liver mouse model susceptible to HCV infection [90-92]. SR-BI was also demonstrated to be important for cell-to-cell transmission of virus, and thus this mean of propagation can be blocked by antibody or small molecule, such as ITX-5061 (iTherX), a new promising drug currently challenged in phase IIa trials [93,94]. Very

recently a plant-derived flavonoid, BJ486K was shown to disrupt HCV entry in vitro by a mechanism of action distinct from SR-B1 inhibition [95]. Additional entry factors have been recently discovered: the epidermal growth factor receptor (EGFR), the ephrin receptor A4 (EphA2) and the niemann-pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor (NPC1L1) [96,97]. Interestingly, each of those receptors has an FDA-approved drug: Erlotinib (EGFR inhibitor) for the treatment of several types of cancer [98,99], dasatinib (Eph2A inhibitor) for chronic myelogenous and acute lymphoblastic leukemias [100], and Ezetimibe (NPC1L1 inhibitor) for treatment of hypercholesterolemia [101]. Various experiments have shown that they are efficient HCV entry inhibitors in vitro. It will be interesting to determine the therapeutic potential of these drugs in HCV-infected patients.

The membranous web, a specific HCV-induced structure, is also a target to consider. NS4B alone can form those ER-derived web-like structures [102]. Within that structure, NS5A activates the phosphoinositol-4-kinase III alpha (PI4KIII $\alpha$ ) [103,104], creating an environment highly enriched in phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) [104-107]. The PI4P localization is shifted upon infection: the plasma membrane pool is decreased, while the intracellular pool is enriched [107]. This environment creates a virus-host interface that favors HCV replication, and is an attractive target due to its high specialization. It was recently shown that PI4K inhibitors, like PIK93 and 4-anilino quinazoline (AL-9) family, efficiently inhibit replication in both genotype 1 and 2 [107,108]. AL-9 was thought to be an NS5A inhibitor, since resistance mutations mostly mapped to this protein. Reverse genetics could not confirm a resistant phenotype, suggesting that these compounds target a cellular function. Their activities are most probably due to an inhibition of the PI4KIII $\alpha$  enzyme [107]. The 4-anilino quinazoline-derived compound A-831/AZD2836 (AstraZeneca) was tested in clinical trial, but was abandoned due to low bioavailability [109]. Although inhibiting the host enzyme proved efficient, another approach is to block protein interaction between NS5A and PI4KIII $\alpha$  thus impairing web morphology and restoring normal PI4P metabolism.

Virus release relies on the VLDL pathway [7] and has been demonstrated to depend on diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT1) [110] and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) [7,111]. DGAT1 knockdown or inhibition were shown to reduce virus release, without affecting cell viability [110]. An inhibitor of DGAT1 (LCQ-908, Novartis) was clinically challenged for numerous applications [112] but unfortunately phase II trial was terminated early for treatment of HCV [113]. MTP blocking agents are an attractive alternative, since they disrupt HCV particle production in vitro [7].

Much work is needed to identify novel host targets and HTAs. The major challenge resides in avoiding undesirable adverse effects by specifically targeting conserved HCV-specific host machineries without disrupting canonical cellular processes. We are now at the crossroad of this research with the rise of system biology approaches based on proteomics, functional

genomics and bioinformatics providing the possibility of more comprehensive type of analysis.

## **CONCLUDING REMARKS**

During the last decade, huge progress has been made in understanding HCV molecular virology and in developing HCV-specific antiviral drugs. The inclusion of first generation PIs to the SOC significantly improved treatment efficacy. However, SVR rates are far from 100% and depend on HCV genotype and patient treatment history. Moreover, adverse effects remain severe and often lead to treatment abandon. To provide successful all oral Peg-IFN/RBV free therapy, next generation of PIs as well as numerous new classes of DAAs and HTAs will be required for therapeutic approach with most appropriate efficacy/risk ratio for a given patient. Furthermore, patient genotyping allows to predict chances of success and to elaborate treatment strategy [114]. Several considerations (summarized in Box 1) for an ideal therapy have emerged from fundamental and clinical studies. In a not-so-far future, HCV chronically-infected patients will hopefully receive a personalized antiviral cocktail based on HCV genotype, host genetic markers, resistance testing, population specifics, and co-morbidity background.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

M.G. is the recipient of a career award from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). M.G. receives funding from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). DL receives funding from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and from the Novartis/Canadian Liver Foundation Hepatology Research Chair.

## **REFERENCE LIST**

1. Tsai WL, Chung RT: Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2010, 29:2309-2324.
2. Rice CM: New insights into HCV replication: potential antiviral targets. *Top Antivir Med* 2011, 19:117-120.
3. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, Andre P: Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 2011, 19:95-103.
4. Ploss A, Dubuisson J: New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut* 2012, 61 Suppl 1:i25-35.
5. Bartenschlager R, Cosset FL, Lohmann V: Hepatitis C virus replication cycle. *J Hepatol* 2010, 53:583-585.
6. Alvisi G, Madan V, Bartenschlager R: Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection. *RNA Biol* 2011, 8:258-269.

7. Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Jr., Ye J: Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:5848-5853.
8. Halfon P, Sarrazin C: Future treatment of chronic hepatitis C with direct acting antivirals: is resistance important? *Liver Int* 2012, 32 Suppl 1:79-87.
9. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, et al.: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002, 347:975-982.
10. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001, 358:958-965.
11. Welsch C, Jesudian A, Zeuzem S, Jacobson I: New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut* 2012, 61 Suppl 1:i36-46.
12. Sarrazin C, Hezode C, Zeuzem S, Pawlotsky JM: Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2012, 56 Suppl 1:S88-100.
13. Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, Serrano-Wu MH, Langley DR, Sun JH, O'Boyle DR, 2nd, et al.: Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 2010, 465:96-100.
14. Pol S, Ghalib RH, Rustgi VK, Martorell C, Everson GT, Tatum HA, Hezode C, Lim JK, Bronowicki JP, Abrams GA, et al.: Daclatasvir for previously untreated chronic hepatitis C genotype-1 infection: a randomised, parallel-group, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, phase 2a trial. *Lancet Infect Dis* 2012.
15. Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, Sorensen RD, Symonds WT, Hindes RG, Berrey MM: Once Daily GS-7977 Plus Ribavirin in HCV Genotypes 1-3: The ELECTRON Trial. 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain 2012:Abstract 1113.
16. Hashimoto C, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Tamamura H: The successes and failures of HIV drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2011, 6:1067-1090.
17. Gane EJ, Roberts SK, Stedman CA, Angus PW, Ritchie B, Elston R, Ipe D, Morcos PN, Baher L, Najera I, et al.: Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet* 2010, 376:1467-1475.
18. Sulkowski M, Gardiner D, Lawitz E, Hiney F, Nelson D, Thuluvath P, Rodriguez-Torres M, Lok A, Schwartz H, Reddy K, et al.: Potent viral suppression with all-oral combination of daclatasvir (NS5A inhibitor) and GS-7977 (NS5B inhibitor), +/-ribavirin, in treatment-naïve patients with chronic HCV GT1, 2, or 3. 47th Annual Meeting of the

- European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain 2012:LB abstract 1422.
19. Sulkowski M, Rodriguez-Torres M, Lawitz E, Shiffman M, Pol S, Herring R, McHutchison J, Pang P, Brainard D, Wyles D, et al.: High sustained virologic response rate in treatment-naïve HCV genotype 1a and 1b patients treated for 12 weeks with an interferon-free all-oral quad regimen: Interim results 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain 2012:LB abstract 1421.
  20. Morikawa K, Lange CM, Gouttenoire J, Meylan E, Brass V, Penin F, Moradpour D: Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 2011, 18:305-315.
  21. Raney KD, Sharma SD, Moustafa IM, Cameron CE: Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. *J Biol Chem* 2010, 285:22725-22731.
  22. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, et al.: The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol* 2007, 81:8030-8040.
  23. Lam AM, Frick DN: Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *J Virol* 2006, 80:404-411.
  24. Mackintosh SG, Lu JZ, Jordan JB, Harrison MK, Sikora B, Sharma SD, Cameron CE, Raney KD, Sakon J: Structural and biological identification of residues on the surface of NS3 helicase required for optimal replication of the hepatitis C virus. *J Biol Chem* 2006, 281:3528-3535.
  25. Hanson AM, Hernandez JJ, Shadrick WR, Frick DN: Identification and analysis of inhibitors targeting the hepatitis C virus NS3 helicase. *Methods Enzymol* 2012, 511:463-483.
  26. Frick DN: HCV Helicase: Structure, Function, and Inhibition. 2006.
  27. Ma Y, Yates J, Liang Y, Lemon SM, Yi M: NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol* 2008, 82:7624-7639.
  28. Beran RK, Pyle AM: Hepatitis C viral NS3-4A protease activity is enhanced by the NS3 helicase. *J Biol Chem* 2008, 283:29929-29937.
  29. Beran RK, Serebrov V, Pyle AM: The serine protease domain of hepatitis C viral NS3 activates RNA helicase activity by promoting the binding of RNA substrate. *J Biol Chem* 2007, 282:34913-34920.
  30. Rajagopal V, Gurjar M, Levin MK, Patel SS: The protease domain increases the translocation stepping efficiency of the hepatitis C virus NS3-4A helicase. *J Biol Chem* 2010, 285:17821-17832.



31. Pan RY, Hung TM, Kou YH, Chan NL, Chang MF, Chang SC: In trans interaction of hepatitis C virus helicase domains mediates protease activity critical for internal NS3 cleavage and cell transformation. *FEBS Lett* 2010, 584:482-486.
32. Ding SC, Kohlway AS, Pyle AM: Unmasking the active helicase conformation of nonstructural protein 3 from hepatitis C virus. *J Virol* 2011, 85:4343-4353.
33. Wilsher NE, Saalau-Bethell S, Carr M, Chessari G, Chiarparin E, Coyle J, Fazal L, Graham B, C. Hamlett, Hiscock S, et al.: Preclinical characterisation of a novel allosteric inhibitor of the HCV full length NS3/4a protein. 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain 2012:Abstract 878.
34. Einav S, Gerber D, Bryson PD, Sklan EH, Elazar M, Maerkl SJ, Glenn JS, Quake SR: Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nat Biotechnol* 2008, 26:1019-1027.
35. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00945880?term=clean-1&rank=1>.
36. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, et al.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005, 11:791-796.
37. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, et al.: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005, 309:623-626.
38. Steinmann E, Pietschmann T: Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* 2010, 2:2078-2095.
39. Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N: 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* 2003, 100:6104-6108.
40. Premkumar A, Wilson L, Ewart GD, Gage PW: Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett* 2004, 557:99-103.
41. Pavlovic D, Fischer W, Hussey M, Durantel D, Durantel S, Branza-Nichita N, Woodhouse S, Dwek RA, Zitzmann N: Long alkylchain iminosugars block the HCV p7 ion channel. *Adv Exp Med Biol* 2005, 564:3-4.
42. Griffin S, StGelais C, Owsianka AM, Patel AH, Rowlands D, Harris M: Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel. *Hepatology* 2008, 48:1779-1790.
43. StGelais C, Foster TL, Verow M, Atkins E, Fishwick CW, Rowlands D, Harris M, Griffin S: Determinants of hepatitis C virus p7 ion channel function and drug sensitivity identified in vitro. *J Virol* 2009, 83:7970-7981.

44. Khoury G, Ewart G, Luscombe C, Miller M, Wilkinson J: Antiviral efficacy of the novel compound BIT225 against HIV-1 release from human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54:835-845.
45. Tanwandee T, Luscombe C, Achenbach C, Ewart G, Miller M, Wilkinson J, Murphy R: Antiviral activity and tolerability of BIT225 plus pegylated interferon alpha 2a or 2b and weight-based ribavirin for 28 days in HCV treatment-naïve monoinfected patients. *HEP DART 2011 Frontiers in Drug Development for Viral Hepatitis*, December 4-8, 2011, Kauai, USA 2011:Abstract 58.
46. Luscombe CA, Huang Z, Murray MG, Miller M, Wilkinson J, Ewart GD: A novel Hepatitis C virus p7 ion channel inhibitor, BIT225, inhibits bovine viral diarrhea virus in vitro and shows synergism with recombinant interferon-alpha-2b and nucleoside analogues. *Antiviral Res* 2010, 86:144-153.
47. Matsumura T, Kato T, Sugiyama N, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, Wakita T, Imawari M: 25-hydroxyvitamin D(3) suppresses hepatitis C virus production. *Hepatology* 2012.
48. Kota S, Takahashi V, Ni F, Snyder JK, Strosberg AD: Direct binding of a hepatitis C virus inhibitor to the viral capsid protein. *PLoS One* 2012, 7:e32207.
49. Ni F, Kota S, Takahashi V, Strosberg AD, Snyder JK: Potent inhibitors of hepatitis C core dimerization as new leads for anti-hepatitis C agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2011, 21:2198-2202.
50. Strosberg AD, Kota S, Takahashi V, Snyder JK, Mousseau G: Core as a novel viral target for hepatitis C drugs. *Viruses* 2010, 2:1734-1751.
51. Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, et al.: Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* 2008, 82:7964-7976.
52. Jiang J, Luo G: Cell Culture Adaptive Mutations Promote Viral Protein-Protein Interactions and Morphogenesis of Infectious Hepatitis C Virus. *J Virol* 2012.
53. Jones DM, Atoom AM, Zhang X, Kottlilil S, Russell RS: A genetic interaction between the core and NS3 proteins of hepatitis C virus is essential for production of infectious virus. *J Virol* 2011, 85:12351-12361.
54. Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, et al.: Novel Cell Culture-Adapted Genotype 2a Hepatitis C Virus Infectious Clone. *J Virol* 2012.
55. Stapleford KA, Lindenbach BD: Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J Virol* 2011, 85:1706-1717.

56. Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, Bartenschlager R: Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog* 2010, 6:e1001233.
57. Wilkin TJ, Gulick RM: CCR5 antagonism in HIV infection: current concepts and future opportunities. *Annu Rev Med* 2012, 63:81-93.
58. Paeshuyse J, Kaul A, De Clercq E, Rosenwirth B, Dumont JM, Scalfaro P, Bartenschlager R, Neyts J: The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* 2006, 43:761-770.
59. Foster TL, Gallay P, Stonehouse NJ, Harris M: Cyclophilin A interacts with domain II of hepatitis C virus NS5A and stimulates RNA binding in an isomerase-dependent manner. *J Virol* 2011, 85:7460-7464.
60. Verdegem D, Badillo A, Wieruszkeski JM, Landrieu I, Leroy A, Bartenschlager R, Penin F, Lippens G, Hanouille X: Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A. *J Biol Chem* 2011, 286:20441-20454.
61. Coelmont L, Hanouille X, Chatterji U, Berger C, Snoeck J, Bobardt M, Lim P, Vliegen I, Paeshuyse J, Vuagniaux G, et al.: DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS One* 2010, 5:e13687.
62. Flisiak R, Feinman SV, Jablkowski M, Horban A, Kryczka W, Pawlowska M, Heathcote JE, Mazzella G, Vandelli C, Nicolas-Metral V, et al.: The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naive hepatitis C patients. *Hepatology* 2009, 49:1460-1468.
63. Crabbe R, Vuagniaux G, Dumont JM, Nicolas-Metral V, Marfurt J, Novaroli L: An evaluation of the cyclophilin inhibitor Debio 025 and its potential as a treatment for chronic hepatitis C. *Expert Opin Investig Drugs* 2009, 18:211-220.
64. Pawlotsky JM, Sarin SK, Foster GR, Peng CY, Rasenack J, Flisiak R, Piratvisuth T, Wedemeyer WL, Chuang H, Zhang WM, et al.: Alisporivir plus ribavirin is highly effective as interferon-free or interferon-add-on regimen in previously untreated HCV-G2 or G3 patients: SVR12 results from VITAL-1 Phase 2b study. 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain 2012.
65. Hopkins S, Bobardt M, Chatterji U, Garcia-Rivera JA, Lim P, Gallay PA: The Cyclophilin Inhibitor SCY-635 Disrupts Hepatitis C Virus NS5A-Cyclophilin A Complexes. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56:3888-3897.
66. Lawitz E, Godofsky E, Rouzier R, Marbury T, Nguyen T, Ke J, Huang M, Praestgaard J, Serra D, Evans TG: Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of the cyclophilin inhibitor NIM811 alone or in combination with pegylated interferon in HCV-infected patients receiving 14 days of therapy. *Antiviral Res* 2011, 89:238-245.

67. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Orum H: Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010, 327:198-201.
68. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P: Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005, 309:1577-1581.
69. Esteller M: Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011, 12:861-874.
70. Chang J, Guo JT, Jiang D, Guo H, Taylor JM, Block TM: Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J Virol* 2008, 82:8215-8223.
71. Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M: microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 2008, 27:3300-3310.
72. Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM: Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108:3193-3198.
73. Reesink HW, Janssen HLA, Zeuzem S, Lawitz E, Rodriguez-Torres M, Patel K, Chen A, Davis C, King B, Levin AA, et al.: Final Results: Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Safety, Anti-viral, Proof of Concept Study of Miravirsen, an Oligonucleotide Targeting miR-122, in Treatment-Naïve Patients with Genotype 1 Chronic HCV Infection. 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain 2012.
74. Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, et al.: Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 2003, 278:41003-41012.
75. 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, 80:10579-10590.
76. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX: Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:12766-12771.
77. Albecka A, Belouzard S, Op de Beeck A, Descamps V, Goueslain L, Bertrand-Michel J, Terce F, Duverlie G, Rouille Y, Dubuisson J: Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 2012, 55:998-1007.
78. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A: The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002, 21:5017-5025.
79. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, et al.: Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998, 282:938-941.

80. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM: Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007, 446:801-805.
81. Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, Song X, Ding M, Deng H: Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 2007, 81:12465-12471.
82. Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, Cormier E, Lavillette D, Cosset FL, Dragic T: The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 2008, 82:3555-3560.
83. Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T: Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 2009, 83:2011-2014.
84. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM: Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009, 457:882-886.
85. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouille Y: Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2006, 80:6964-6972.
86. Meunier JC, Engle RE, Faulk K, Zhao M, Bartosch B, Alter H, Emerson SU, Cosset FL, Purcell RH, Bukh J: Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:4560-4565.
87. Scheel TK, Gottwein JM, Jensen TB, Prentoe JC, Hoegh AM, Alter HJ, Eugen-Olsen J, Bukh J: Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:997-1002.
88. Schiano TD, Charlton M, Younossi Z, Galun E, Pruett T, Tur-Kaspa R, Eren R, Dagan S, Graham N, Williams PV, et al.: Monoclonal antibody HCV-AbXTL68 in patients undergoing liver transplantation for HCV: results of a phase 2 randomized study. *Liver Transpl* 2006, 12:1381-1389.
89. Meuleman P, Bukh J, Verhoye L, Farhoudi A, Vanwolleghem T, Wang RY, Desombere I, Alter H, Purcell RH, Leroux-Roels G: In vivo evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus. *Hepatology* 2011, 53:755-762.
90. Lacek K, Vercauteren K, Grzyb K, Naddeo M, Verhoye L, Slowikowski MP, Fafi-Kremer S, Patel AH, Baumert TF, Folgori A, et al.: Novel human SR-BI antibodies prevent infection and dissemination of HCV in vitro and in humanized mice. *J Hepatol* 2012, 57:17-23.

91. Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV, Timpe JM, Krieger SE, Baumert TF, Tellinghuisen TL, et al.: Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* 2011, 85:596-605.
92. Meuleman P, Catanese MT, Verhoye L, Desombere I, Farhoudi A, Jones CT, Sheahan T, Grzyb K, Cortese R, Rice CM, et al.: A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology* 2012, 55:364-372.
93. Zhu H, Wong-Staal F, Lee H, Syder A, McKelvy J, Schooley RT, Wyles DL: Evaluation of ITX 5061, a scavenger receptor B1 antagonist: resistance selection and activity in combination with other hepatitis C virus antivirals. *J Infect Dis* 2012, 205:656-662.
94. Syder AJ, Lee H, Zeisel MB, Grove J, Soulier E, Macdonald J, Chow S, Chang J, Baumert TF, McKeating JA, et al.: Small molecule scavenger receptor B1 antagonists are potent HCV entry inhibitors. *J Hepatol* 2011, 54:48-55.
95. Haid S, Novodomska A, Gentsch J, Grethe C, Geuenich S, Bankwitz D, Chhatwal P, Jannack B, Hennebelle T, Bailleul F, et al.: A plant-derived flavonoid inhibits entry of all HCV genotypes into human hepatocytes. *Gastroenterology* 2012, 143:213-222 e215.
96. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, Mee CJ, Turek M, Gorke S, et al.: EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011, 17:589-595.
97. Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Arefai WA, et al.: Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 2012, 18:281-285.
98. Minna JD, Dowell J: Erlotinib hydrochloride. *Nat Rev Drug Discov* 2005, Suppl:S14-15.
99. Comis RL: The current situation: erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa) in non-small cell lung cancer. *Oncologist* 2005, 10:467-470.
100. Kantarjian H, Jabbour E, Grimley J, Kirkpatrick P: Dasatinib. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5:717-718.
101. Earl J, Kirkpatrick P: Fresh from the pipeline. Ezetimibe. *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2:97-98.
102. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K: Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002, 76:5974-5984.
103. Lim YS, Hwang SB: Hepatitis C virus NS5A protein interacts with phosphatidylinositol 4-kinase type IIIalpha and regulates viral propagation. *J Biol Chem* 2011, 286:11290-11298.
104. Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, Kaderali L, Poenisch M, Blankenburg H, Hiet MS, et al.: Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 2011, 9:32-45.

105. Berger KL, Kelly SM, Jordan TX, Tartell MA, Randall G: Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication. *J Virol* 2011, 85:8870-8883.
106. Tai AW, Salloum S: The role of the phosphatidylinositol 4-kinase PI4KA in hepatitis C virus-induced host membrane rearrangement. *PLoS One* 2011, 6:e26300.
107. Bianco A, Reghellin V, Donnici L, Fenu S, Alvarez R, Baruffa C, Peri F, Pagani M, Abrignani S, Neddermann P, et al.: Metabolism of phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha-dependent PI4P Is subverted by HCV and is targeted by a 4-anilino quinazoline with antiviral activity. *PLoS Pathog* 2012, 8:e1002576.
108. Borawski J, Troke P, Puyang X, Gibaja V, Zhao S, Mickanin C, Leighton-Davies J, Wilson CJ, Myer V, Cornellataracido I, et al.: Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *J Virol* 2009, 83:10058-10074.
109. Schmitz U, Tan SL: NS5A--from obscurity to new target for HCV therapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2008, 3:77-92.
110. Herker E, Harris C, Hernandez C, Carpentier A, Kaehlcke K, Rosenberg AR, Farese RV, Jr., Ott M: Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med* 2010, 16:1295-1298.
111. Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV: Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 2008, 82:2120-2129.
112. Birch AM, Buckett LK, Turnbull AV: DGAT1 inhibitors as anti-obesity and anti-diabetic agents. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2010, 13:489-496.
113.  
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01387958?term=LCQ908&cond=hepatitis&rank=1>.
114. Hayes CN, Imamura M, Aikata H, Chayama K: Genetics of IL28B and HCV-response to infection and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012, 9:406-417.
115. Poordad F, Lawitz E, Kowdley KV, Everson GT, Freilich B, Cohen D, Siggelkow S, Heckaman M, Menon R, Pilot-Matias T, et al.: 12-Week Interferon-Free Regimen of ABT-450/r+ABT-333+Ribavirin Achieved SVR12 in More Than 90% of Treatment-Naïve HCV Genotype-1-Infected Subjects and 47% of Previous Non-Responders. 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain 2012:LB abstract 1399.
116. Lawitz E, Poordad F, Kowdley KV, Jensen D, Cohen DE, Siggelkow S, Wikstrom K, Larsen L, Menon RM, Podsadecki T, et al.: A 12-Week Interferon-Free Regimen of ABT-450/r, ABT-072, and Ribavirin was Well Tolerated and Achieved Sustained Virologic Response in 91% Treatment-Naïve HCV IL28B-CC Genotype-1-Infected Subject 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain 2012:LB abstract 13.

117. Suzuki F, Ikeda K, Toyota J, Karino Y, Ohmura T, Chayama K, Takahashi S, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, et al.: Dual oral therapy with the NS5A inhibitor daclatasvir (BMS-790052) and NS3 protease inhibitor asunaprevir (BMS-650032) in HCV genotype 1b-infected null responders or ineligible/intolerant to PEGIFN 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain 2012:LB abstract 2344.
118. Chayama K, Takahashi S, Toyota J, Karino Y, Ikeda K, Ishikawa H, Watanabe H, McPhee F, Hughes E, Kumada H: Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders. *Hepatology* 2012, 55:742-748.
119. Zeuzem S, Soriano V, Asselah T, Bronowicki JP, Lohse A, Mullhaupt B, Schuchmann M, Bourliere M, Buti M, Roberts S, et al.: SVR4 and SVR12 with an interferon-free regimen of BI201335 and BI207127, +/- ribavirin, in treatment-naïve patients with genotype-1 HCV infection: Interim results of SOUND-C2 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain 2012:Abstract 101.
120. Gane EJ, Pockros P, Zeuzem S, Marcellin P, Shikhman A, Bernaards C, Yetzer E, Shulman NS, Tong X, Nájera I, et al.: Interferon-free treatment with a combination of mericitabine and danoprevir/r with or without ribavirin in treatment-naïve hcv genotype 1-infected patients. 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain 2012:LB abstract 1412.
121. Penney MS, DeSouza C, Seepersaud S, Alves K, Koziel MJ, Kauffman RS, DiBisceglie AM, Botfield MC, Group ZS: Patients of all IL28B Genotypes have High SVR Rates when Treated with VX-222 in Combination with Telaprevir/Peginterferon/Ribavirin in the ZENITH Study 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain 2012:Abstract 1203.
122. Zeuzem S, Buggisch P, Agarwal K, Marcellin P, Sereni D, Klinker H, Moreno C, Zarski JP, Horsmans Y, Mo H, et al.: The protease inhibitor, GS-9256, and non-nucleoside polymerase inhibitor tegobuvir alone, with ribavirin, or pegylated interferon plus ribavirin in hepatitis C. *Hepatology* 2012, 55:749-758.
123. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01628692?term=tmc-435+bms-790052&rank=1>.
124. [http://www.medivir.se/v4/en/ir\\_media/pressrelease.cfm?year=2012&releaseid=659101](http://www.medivir.se/v4/en/ir_media/pressrelease.cfm?year=2012&releaseid=659101).
125. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01482403?term=mericitabine+victrelis&rank=1>.
126. Chatel-Chaix L, Melancon P, Racine ME, Baril M, Lamarre D: Y-box-binding protein 1 interacts with hepatitis C virus NS3/4A and influences the equilibrium between viral RNA replication and infectious particle production. *J Virol* 2011, 85:11022-11037.
127. Lim YS, Tran HT, Park SJ, Yim SA, Hwang SB: Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 is a cellular factor required for hepatitis C virus propagation. *J Virol* 2011, 85:8777-8788.



128. Taguwa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J Virol* 2008, 82:2631-2641.
129. Berger KL, Cooper JD, Heaton NS, Yoon R, Oakland TE, Jordan TX, Mateu G, Grakoui A, Randall G: Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:7577-7582.
130. Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G: Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* 2007, 81:13783-13793.
131. Jiang J, Cun W, Wu X, Shi Q, Tang H, Luo G: Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein e binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2012, 86:7256-7267.
132. Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S: La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis* 2010, 202:75-85.
133. Ali N, Pruijn GJ, Kenan DJ, Keene JD, Siddiqui A: Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* 2000, 275:27531-27540.
134. Rosenfeld AB, Racaniello VR: Hepatitis C virus internal ribosome entry site-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae* is independent of polypyrimidine tract-binding protein, poly(rC)-binding protein 2, and La protein. *J Virol* 2005, 79:10126-10137.
135. Wang L, Jeng KS, Lai MM: Poly(C)-binding protein 2 interacts with sequences required for viral replication in the hepatitis C virus (HCV) 5' untranslated region and directs HCV RNA replication through circularizing the viral genome. *J Virol* 2011, 85:7954-7964.
136. Paek KY, Kim CS, Park SM, Kim JH, Jang SK: RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 2008, 82:12082-12093.
137. Hahm B, Kim YK, Kim JH, Kim TY, Jang SK: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 1998, 72:8782-8788.
138. Hwang B, Lim JH, Hahm B, Jang SK, Lee SW: hnRNP L is required for the translation mediated by HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 378:584-588.
139. Kim JH, Paek KY, Ha SH, Cho S, Choi K, Kim CS, Ryu SH, Jang SK: A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. *Mol Cell Biol* 2004, 24:7878-7890.
140. Liu HM, Aizaki H, Choi KS, Machida K, Ou JJ, Lai MM: SYNCRIP (synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein) is a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* 2009, 386:249-256.

141. Weinlich S, Huttelmaier S, Schierhorn A, Behrens SE, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH: IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA* 2009, 15:1528-1542.
142. Scheller N, Mina LB, Galao RP, Chari A, Gimenez-Barcons M, Noueiry A, Fischer U, Meyerhans A, Diez J: Translation and replication of hepatitis C virus genomic RNA depends on ancient cellular proteins that control mRNA fates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:13517-13522.
143. Chatterji U, Bobardt M, Selvarajah S, Yang F, Tang H, Sakamoto N, Vuagniaux G, Parkinson T, Gally P: The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication. *J Biol Chem* 2009, 284:16998-17005.
144. Liu Z, Yang F, Robotham JM, Tang H: Critical role of cyclophilin A and its prolyl-peptidyl isomerase activity in the structure and function of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol* 2009, 83:6554-6565.
145. Jangra RK, Yi M, Lemon SM: DDX6 (Rck/p54) is required for efficient hepatitis C virus replication but not for internal ribosome entry site-directed translation. *J Virol* 2010, 84:6810-6824.
146. Amako Y, Sarkeshik A, Hotta H, Yates J, 3rd, Siddiqui A: Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2009, 83:9237-9246.
147. Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, Roingard P, Descamps V, Duverlie G, Ciczora Y, Wychowski C, Dubuisson J, Rouille Y: Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2010, 84:773-787.
148. Tu H, Gao L, Shi ST, Taylor DR, Yang T, Mircheff AK, Wen Y, Gorbalenya AE, Hwang SB, Lai MM: Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 1999, 263:30-41.
149. Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, et al.: Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 2005, 79:13473-13482.
150. Backes P, Quinkert D, Reiss S, Binder M, Zayas M, Rescher U, Gerke V, Bartenschlager R, Lohmann V: Role of annexin A2 in the production of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* 2010, 84:5775-5789.
151. Saxena V, Lai CK, Chao TC, Jeng KS, Lai MM: Annexin A2 is involved in the formation of hepatitis C virus replication complex on the lipid raft. *J Virol* 2012, 86:4139-4150.
152. Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N: DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2007, 81:13922-13926.
153. Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Tan YH, Lim SG, Fuller-Pace F, Hong W: Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J Virol* 2004, 78:5288-5298.

154. Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, Murakami S: Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol* 2006, 80:3332-3340.
155. Kim CS, Seol SK, Song OK, Park JH, Jang SK: An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *J Virol* 2007, 81:3852-3865.
156. Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J* 2006, 25:5015-5025.
157. Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, et al.: Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 2011, 410:38-47.
158. Wang C, Gale M, Jr., Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, Ye J: Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell* 2005, 18:425-434.
159. Chen YC, Su WC, Huang JY, Chao TC, Jeng KS, Machida K, Lai MM: Polo-like kinase 1 is involved in hepatitis C virus replication by hyperphosphorylating NS5A. *J Virol* 2010, 84:7983-7993.
160. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, et al.: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol* 2009, 83:5137-5147.
161. Parent R, Qu X, Petit MA, Beretta L: The heat shock cognate protein 70 is associated with hepatitis C virus particles and modulates virus infectivity. *Hepatology* 2009, 49:1798-1809.
162. Pei R, Chen H, Lu L, Zhu W, Beckebaum S, Cicinnati V, Lu M, Chen X: Hepatitis C virus infection induces the expression of amphiregulin, a factor related to the activation of cellular survival pathways and required for efficient viral assembly. *J Gen Virol* 2011, 92:2237-2248.
163. Bishe B, Syed GH, Field SJ, Siddiqui A: Role of phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) and its binding protein GOLPH3 in HCV secretion. *J Biol Chem* 2012.
164. Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MM: Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002, 292:198-210.
165. Yi M, Ma Y, Yates J, Lemon SM: Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. *PLoS Pathog* 2009, 5:e1000403.
166. Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J: Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* 2008, 4:e1000032.

### **PAPERS OF OUTSTANDING INTEREST (\*\*)**

Ref. 13; Gao et al.: The authors reported the first-in-class NS5A inhibitor with antiviral potency in HCV-infected patients.

Ref. 17; Bane et al.: This study provided the first proof-of-concept of the improvement of a therapy that combines two DAAs with Peg-IFN/Rib.

Ref. 67; Lanford et al.: This paper showed that the pharmacological inhibition of miR122 with Miravirsen suppressed viremia in HCV-infected chimpanzees, demonstrating that this HTA was a very promising new antiviral drug.

Ref. 104; Reiss et al.: The authors demonstrated that NS5A increases the amounts of cellular PI4P through the direct activation of PI4KIII $\alpha$ . This kinase is shown to be critical for HCV replication and membranous web integrity.

### **PAPERS OF SPECIAL INTEREST (\*)**

Ref. 46; Luscombe et al.: This paper describes the HCV P7 inhibitor BIT225 as a new class of DAA that substantially improves Peg-IFN/Rib treatment in HCV-infected patients.

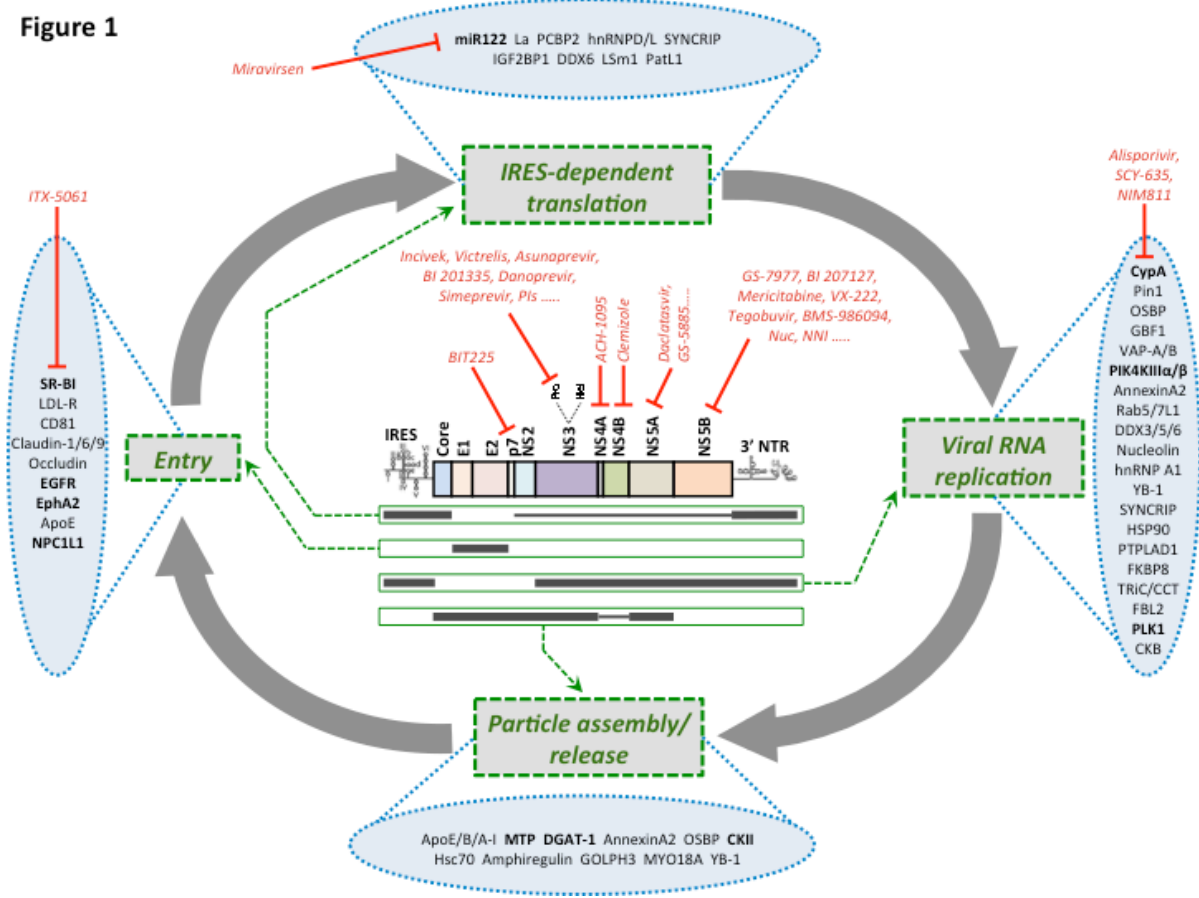
Ref. 49; Ni et al.: Using in vitro core multimerization assays, the authors identified compounds that inhibit HCV infection in cultured cells presumably at the step of particle assembly.

Ref. 95; Haid et al.: The authors show that lanadein (BJ486K), a flavonoid inhibit HCV entry of all major genotypes at a post-attachment step by a mechanism of action that differs from the one of SR-BI inhibition.

Company(ies)	Compounds (class of inhibitor)	Study name	Ref.	Remarks
Bristol-Myers Squibb +Gilead	<b>Daclatasvir</b> /BMS-790052 (NS5A In)+ <b>GS-7977</b> (Nuc)+/-RBV	A1444-040	[18]	PI/Peg-IFN/RBV-free all-oral regimen. Very good efficacy. SVR4: 100% (gt1), >90% (gt2/3)
Abbott	Ritonavir-boosted <b>ABT-450</b> (PI)+ <b>ABT-333</b> (NNI)+RBV	M12-746	[115]	SVR12: 91% (naive), 47% (previously non responders)
Abbott	Ritonavir-boosted <b>ABT-450</b> (PI)+ <b>ABT-072</b> (NNI)+RBV	M12-267	[116]	SVR24: 91% in patients having the favorable CC IL28 genotype
Bristol-Myers Squibb	<b>Daclatasvir</b> /BMS-790052 (NS5A In) + <b>Asunaprevir</b> /BMS-650032 (PI)	A1447-017	[117] [118]	Oral Peg-IFN/RBV-free regimen; SVR24=77% in prior null-responders and patients ineligible/intolerant to Peg-IFN/RBV
Boehringer Ingelheim	<b>BI 201335</b> (PI)+ <b>BI 207127</b> (NNI)+RBV	SOUND-C2	[119]	IFN-free regimen. RBV increases SVR rates. Works well with cirrhotic patients
Roche	Ritonavir-boosted <b>Danoprevir</b> /RG7227/(TMN-191 (PI) + <b>Mericitabine</b> /RG7128 (Nuc)+/-RBV	INFORM-SVR	[120]	Gt-dependent efficacy. RBV limits viral breakthrough
Vertex	<b>Incivek</b> /Telaprevir/VX-950 (PI)+ <b>VX-222</b> (NNI) +/- Peg-IFN+/-RBV	ZENITH	[121]	SVR12: 83% for incivek/VX-222/RBV arm
Gilead	<b>GS-9256</b> (PI)+ <b>Tegobuvir</b> /GS-9190 (NNI)+/-Peg-IFN+/-RBV	GS-US-196-0123	[122]	Need for Peg-IFN/RBV for good efficacy
Gilead	<b>GS-5885</b> (NS5A In)+ <b>GS-9451</b> (PI) + <b>Tegobuvir</b> /GS-9190 (NNI)+RBV	NCT01353248	[19]	First combination of three classes of DAAs; SVR12=100% with the highest dose for the longest regimen
Janssen R&D+ Bristol-Myers Squibb	<b>Simeprevir</b> /TMC435 (PI) + <b>Daclatasvir</b> /BMS-790052 (NS5A In)	NCT01628692	[123]	No data
Janssen R&D+ Bristol-Myers Squibb	<b>Simeprevir</b> /TMC435 (PI)+ <b>BMS-986094</b> /INX-189 (Nuc)	N/A	[124]	No data
Merk & Co+Roche	<b>Victrelis</b> /Boceprevir/SCH 503034 (PI) + <b>Mericitabine</b> /RG7128 (Nuc)+Peg-IFN/RBV	NCT01482403	[125]	No data.

**Table I: Phase II DAA-based combination clinical trials.** PI: NS3 protease inhibitor; NS5A In: NS5A inhibitor; Nuc: Nucleoside NS5B polymerase inhibitor; NNI: Non nucleoside NS5B polymerase inhibitor. Gt: genotype; N/A: not available

**Figure 1**



**Figure 1: Schematic representation of HCV life cycle with host factor regulators.** Several examples of host factors involved in HCV entry, translation, replication and assembly are indicated in the blue insets [7,68,71,76,78-82,84,96,97,110,111,126-166]. Pharmacological inhibition of those written in bold has been shown to affect HCV life cycle. In the center of the diagram, a schematic of the HCV genome is shown with annotations for each viral protein. Large and thick dark-grey bars indicate the HCV components that have major and minor role in each step of the life cycle (indicated by green arrows), respectively. DAAs and HTAs currently challenged in phase II-III-IV clinical trials are shown in red.

**Box 1: Considerations for the development of optimal and personalized antiviral therapies**

- ✓ Increase as much as possible the barrier to resistance (combination therapies)
- ✓ Pan-genotypic therapies
- ✓ All-oral therapies; regimen and dosing simplification
- ✓ Shorten treatment duration
- ✓ Limit adverse effects by targeting HCV-specific machineries
- ✓ Back-up treatment strategy if rapid emergence of resistant mutants
- ✓ Evaluate the population of pre-existing resistant quasi-species for treatment failure prediction
- ✓ Consider treatment history for patients who previously failed therapy (viral relapsers and null responders)
- ✓ Patient genotyping for genes that are good predictors of treatment success (i.e *IL28B* for SOC)
- ✓ Develop efficient therapies for populations difficult to treat:
  - HIV/HCV co-infected patients
  - Patients with a high viral load
  - Patients with cirrhosis/ advanced fibrosis
  - Injection drug users

