

Université de Montréal

**Rôle de la structure du génome viral sur la réplication du
virus de l'hépatite C.**

par

Elodie Rance

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat (Ph.D)
en microbiologie et immunologie

Février, 2013

© Elodie Rance, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Rôle de la structure du génome viral sur la réplication du virus
de l'hépatite C.**

Présentée par :
Elodie Rance

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Cohen Éric A, président-rapporteur
Dre Alfieri Carolina, directrice de recherche
Dr Lemay Guy, membre du jury
Dr Götte Matthias, examinateur externe
Dr Lippé Roger, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le virus de l'hépatite C (VHC) touche 3% de la population mondiale et environ 30% des patients chroniquement infectés développeront une fibrose hépatique. Son génome est un ARN simple brin de polarité positive qui possède un cadre ouvert de lecture flanqué de deux régions non traduites hautement conservées. Différents facteurs peuvent influencer le cycle de réplication du VHC. Deux d'entre eux ont été étudiés dans cette thèse.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à l'effet des structures secondaires et tertiaires du génome sur la réplication du VHC. Les extrémités 5' et 3' du génome contiennent des structures ARN qui régulent la traduction et la réplication du VHC. Le 3'UTR est un élément structural très important pour la réplication virale. Cette région est constituée d'une région variable, d'une séquence poly(U/C) et d'un domaine hautement conservé appelé région X. Des études *in vitro* ont montré que le 3'UTR possède plusieurs structures ARN double brin. Cependant, les structures ARN telles qu'elles existent dans le 3'UTR dans un contexte de génome entier et dans des conditions biologiques étaient inconnues. Pour élucider cette question, nous avons développé une méthode *in situ* pour localiser les régions ARN simple brin et double brin dans le 3'UTR du génome du VHC. Comme prédit par les études antérieures, nous avons observé qu'*in situ* la région X du 3'UTR du génome présente des éléments ARN double brin. Étonnamment, lorsque la séquence poly (U/UC) est dans un contexte de génome entier, cette région forme une structure ARN double brin avec une séquence située en dehors du 3'UTR, suggérant une interaction ARN-ARN distale. Certaines études ont démontré que des structures ARN présentes aux extrémités 5' et 3' du génome du VHC régulent à la fois la traduction et la réplication du VHC. Cela suggère qu'il y aurait une interaction entre les extrémités du génome qui permettrait de moduler ces deux processus. Dans ce contexte, nous

avons démontré l'existence d'une interaction distale ARN-ARN, impliquant le domaine II du 5'UTR et la séquence codante de NS5B du génome du VHC. En outre, nous avons démontré que cette interaction joue un rôle dans la réplication de l'ARN viral.

Parallèlement, nous avons étudié l'impact d'une molécule immuno-modulatrice sur la réplication du VHC. La fibrose hépatique est une manifestation majeure de l'infection par le VHC. Hors, il a été montré qu'une molécule immuno-modulatrice appelée thalidomide atténue la fibrose chez les patients infectés par le VHC. Cependant, son impact sur la réplication virale était inconnu. Ainsi, nous avons étudié l'effet de cette molécule sur la réplication du VHC *in vitro* et nous avons démontré que la thalidomide active la réplication du virus en inhibant la voie de signalisation de NF- κ B. Ces résultats soulignent l'importance de la voie de signalisation NF- κ B dans le contrôle de la réplication du VHC, et sont à prendre en considération dans l'établissement d'un traitement contre la fibrose hépatique.

Mots-clés : VHC, 5'UTR, 3'UTR, structures ARN, interaction ARN-ARN distale, NS5B, circularisation, réplication, thalidomide, NF- κ B, fibrose.

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) affects 3% of the world's population, and it is estimated that 30% of chronically infected patients will develop liver fibrosis. The HCV genome is a single-strand positive sense RNA, encoding an open reading frame flanked by two highly-conserved untranslated regions (UTR). Several factors can influence the HCV life cycle, two of which have been studied in this thesis.

First, we examined the effect of HCV RNA genome structures on its replication. The 5' and 3' ends of the HCV genome contain RNA structural motifs called cis-acting elements which regulate viral translation and replication. The HCV 3'UTR is very important for HCV replication. This region is a tripartite structure comprising a variable region, a poly(U/C) repeat and a highly-conserved sequence called X-tail. From *in vitro* data the 3'UTR is predicted to form several dsRNA hairpin structures. However, the state of intracellular structures as they exist in the 3'UTR of the complete HCV genome was unknown. To elucidate this question, we developed a method to localize single-strand and double-strand RNA elements *in situ* within the 3'UTR of the HCV genome. In conformity with prior predictions, *in situ* examination of the genomic HCV 3'UTR showed dsRNA elements in the X- tail. Surprisingly, when the poly(U/UC) repeat was presented as part of the whole HCV genome, this region formed a novel dsRNA structure with sequences located outside the 3'UTR. Prior studies have postulated that such RNA elements in the 5' and 3' ends of the HCV genome are involved in both HCV translation and replication. This suggests that there is cross-talk between the ends of the HCV genome to modulate these two processes. In this context, we have demonstrated the existence of a new long range RNA-RNA interaction, involving domain II of the 5'UTR and the NS5B coding sequence in the HCV genome. This distal RNA-RNA interaction between the ends of

the HCV genome suggests that the HCV genome can circularize. Further, we showed that this association affects the replication of HCV RNA.

In parallel, we studied the impact of an immunomodulatory drug on HCV replication. A major disease manifestation of chronic HCV infection is liver fibrosis. It had been shown that the immunomodulatory drug thalidomide could reduce fibrosis in HCV-infected patients. However, its impact on HCV replication was unknown. Therefore, we studied the effect of this drug on HCV replication *in vitro* and demonstrated that thalidomide enhances HCV replication by inhibiting NF- κ B activity. These results highlight the importance of the NF- κ B signaling pathway in controlling HCV replication, and should be considered when evaluating treatment options for liver fibrosis.

Keywords: HCV, 5'UTR, 3'UTR, structural RNA elements, long range RNA-RNA interaction, NS5B, circularization, replication, thalidomide, NF- κ B, fibrosis.

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction	1
I. L'HÉPATITE C	2
1. Historique.....	2
2. Épidémiologie	2
3. Histoire naturelle.....	4
4. Transmission	5
5. Immunité et évasion virale.....	6
6. Traitements contre l'hépatite C.....	13
II. LE VIRUS DE L'HÉPATITE C	17
1. Classification et diversité génétique	17
2. Caractéristiques générales du VHC	20
3. Protéines virales	23
4. Cycle viral	29
III. LES MODÈLES D'ÉTUDE DU VHC	39
1. Modèles cellulaires <i>in vitro</i>	39
2. Modèles animaux	43
IV. STRUCTURES ET FONCTIONS DE L'ARN GÉNOMIQUE DU VHC.....	44
1. Les structures ARN agissant en cis : « <i>cis-acting elements</i> ».....	46
2. Les superstructures du génome du VHC.....	63
V. PROBLÉMATIQUE	66
VI. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....	67
Chapitre 2 : Modèle de VHC de génotype 1b	68
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	70
RÉSULTATS	76
<i>L'ARN génomique ER-1b est traduit dans les cellules transfectées.</i>	76
<i>Production de virus infectieux par les cellules transfectées par l'ARN ER-1b.</i>	76
<i>Infectivité des particules virales ER-1b.</i>	77

<i>Neutralisation de l'infection par l'anticorps anti-CD81 et le sérum de patients infectés.</i>	78
<i>Détection des particules virales dans les cellules infectées par microscopie électronique.</i>	79
FIGURES ET LÉGENDES	80
CONCLUSIONS	83
TRANSITION	85
Chapitre 3 : Article 1	86
ABSTRACT	88
INTRODUCTION	89
MATERIALS AND METHODS	91
RESULTS	98
<i>Validation of ds and ssRNA detection reagents.</i>	98
<i>In vitro mapping of dsRNA structures contained within the 3'UTR.</i>	100
<i>In situ detection of dsRNA and ssRNA structures contained within the HCV 3'UTR RNA fragment.</i>	101
<i>In situ detection of ds and ssRNA structures contained within the 3'UTR sequence of the HCV genome.</i>	103
DISCUSSION	104
ACKNOWLEDGEMENTS	107
REFERENCES	108
LEGENDS TO FIGURES	116
FIGURES AND TABLES	120
TRANSITION	129
Chapitre 4 : Article 2	130
SUMMARY	132
INTRODUCTION	133
MATERIALS AND METHODS	135
RESULTS	142
<i>The 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ RNAs Interact in a Dose-Dependent Manner. . .</i>	142

<i>The Watson-Crick Base Pairing Sequence Is Necessary and Sufficient for the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎-NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ Interaction in the HCV Genome.</i>	144
<i>Role of the Distal RNA-RNA Interaction between the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎ and NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ Sequences in the HCV Life Cycle.</i>	146
DISCUSSION.....	148
ACKNOWLEDGEMENTS.....	152
REFERENCES.....	153
LEGENDS TO FIGURES.....	162
FIGURES AND TABLES.....	166
TRANSITION.....	173
Chapitre 5 : Article 3.....	174
SUMMARY.....	176
INTRODUCTION.....	177
MATERIALS AND METHODS.....	178
RESULTS.....	183
<i>Thalidomide increases hepatitis C virus RNA replication</i>	183
<i>Thalidomide and IKK inhibitors block IL-8 protein synthesis and NF-κB transcription activity in Huh-7 cells.</i>	184
<i>Inhibition of IKK promotes hepatitis C virus RNA replication.</i>	185
<i>Increased IKKα and NF-κB(p65)/RelA, respectively, enhanced or inhibited HCV replication.</i>	186
DISCUSSION.....	187
ACKNOWLEDGEMENTS.....	190
REFERENCES.....	192
LEGENDS TO FIGURES.....	198
FIGURES.....	200
Chapitre 6 : Discussion.....	205
I. LES STRUCTURES ARN ET LEUR FONCTION AU SEIN DU GÉNOME DU VHC.....	206
1. Les régions ARN simple brin et double brin du 3'UTR.....	206

2. La fonction des structures tertiaires du génome du VHC induites par des interactions intramoléculaires	210
II. MÉTHODES D'ANALYSE DES STRUCTURES ARN DU GÉNOME DU VHC	215
1. Analyses chimiques des structures ARN	215
2. Analyses mutationnelles des structures ARN	218
III. FACTEURS DE PERSISTANCE DU VHC	220
1. Les superstructures du génome du VHC.....	220
2. Contrôle de la réponse immunitaire innée	222
IV. STRATÉGIES ANTIVIRALES CONTRE LE VHC.....	224
1. Les oligonucléotides antiviraux	224
2. La régulation de la voie antivirale NF- κ B	226
Conclusion	228
Références.....	230
Annexes.....	293

Liste des tableaux

Chapitre 3

Tableau 3.I. Probe oligonucleotide sequences	120
---	-----

Chapitre 4

Tableau 4.I. Sequences used	166
--	-----

Tableau 4.II. Binding variables of the 5'UTR-NS5B RNA interaction.....	166
---	-----

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1. Prévalence de l'infection du VHC à travers le monde	3
Figure 1.2. Histoire naturelle de l'hépatite C.....	5
Figure 1.3. Le VHC et la réponse immunitaire innée	8
Figure 1.4. Le VHC et la réponse immune adaptative.....	12
Figure 1.5. Arbre phylogénétique (non-raciné) des 6 génotypes du VHC	19
Figure 1.6. Distribution mondiale des génotypes du VHC.....	19
Figure 1.7. Particule virale du virus de l'hépatite C.....	20
Figure 1.8. Le génome et les protéines du VHC.....	22
Figure 1.9. Les protéines du VHC localisées à la membrane du RE.....	23
Figure 1.10. Cycle de réplication du VHC	29
Figure 1.11. Modèle de l'entrée du VHC dans la cellule hôte.....	31
Figure 1.12. Complexe de réplication du VHC	35
Figure 1.13. Modèle de l'assemblage du VHC.....	38
Figure 1.14. Organisation du système réplicon et de certains de ses dérivés	41
Figure 1.15. Structure du 5'UTR du génome du VHC.....	52
Figure 1.16. Initiation de la traduction du VHC	53
Figure 1.17. Structure du 3'UTR du génome du VHC.....	55
Figure 1.18. Structure du 3'UTR des brins (+) et (-) du VHC	56
Figure 1.19. Structures ARN de la région codante de Core	60
Figure 1.20. Structures ARN de la région codante NS5B	62

Chapitre 2

Figure 2.1. Génome ARN du VHC de génotype 1b : ER-1b.....	80
Figure 2.2. Expression des antigènes du VHC dans les cellules transfectées par les ARN génomiques.....	80
Figure 2.3. Production de virus infectieux par les cellules transfectées par ER-1b.....	81
Figure 2.4. Caractérisation du virus de génotype 1b, ER-1b.....	82

Chapitre 3

Figure 3.1. Expression of viral proteins in HCV genome mutants.....	121
Figure 3.2. Secondary structure diagrams of HCV 1b 3'UTR tripartite structure.....	122
Figure 3.3. <i>In vitro</i> recognition modification of the HCV 3'UTR X-tail RNA fragment by psoralen or dimethyl sulfate	123
Figure 3.4. Detection of ss and dsRNA elements in the HCV 1b 3'UTR fragment.....	124
Figure 3.5. <i>In vivo</i> exposure of HCV 1b to psoralen or DMS	125
Figure 3.6. Comparison of <i>in vitro</i> and <i>in situ</i> recognition of ss and dsRNA elements contained within the 3'UTR RNA fragment.....	126
Figure 3.7. Detection of intracellular ss and dsRNA elements in the 3'UTR for the HCV 1b genome.	127
Figure 3.8. Detection of the dsRNA elements in the 3'UTR X-tail for HCV 1b NS mutant genome	128

Chapitre 4

Figure 4.1. ER-1b: a HCV cell culture system	167
Figure 4.2. Interaction between the 5'UTR ₍₁₋₂₉₀₎ and NS5B ₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ molecules is dependent on RNA concentration.....	168
Figure 4.3. Determination of nucleotides necessary for the interaction between the 5'UTR ₍₁₋₂₉₀₎ and the NS5B ₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ sequences.....	169
Figure 4.4. Role of the long-range interaction between the 5'UTR ₍₉₅₋₁₁₀₎ and NS5B ₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ sequences on the HCV life cycle.....	170
Figure 4.5. Circularization of the HCV genome induced by long-range interaction 5'UTR ₍₉₅₋₁₁₀₎ -NS5B ₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎	171
Figure 4.S1. Inverse reactions of binding assays.....	172

Chapitre 5

Figure 5.1. Thalidomide increased replicative (–) strand RNA in hepatitis C virus (HCV)-infected Huh-7 cells.....	200
Figure 5.2. Thalidomide inhibits IL-8 expression and NF-κB activity in Huh-7 cells.....	201
Figure 5.3	202
Figure 5.4. Thalidomide and NF-κB inhibitors increased replicative	203
Figure 5.5. Increased hepatitis C virus (HCV) RNA in cells expressing heightened amounts of IκB kinase (IKK) α and NF-κB(p65)/RelA protein... ..	204

Liste des abréviations

1M7	<i>1-methyl-7-nitroisatoic anhydride</i>
3'UTR	<i>3'untranslated region</i>
5'UTR	<i>5'untranslated region</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALT	alanine aminotransférase
ARFP	<i>alternate reading frame protein</i>
ARN	acide ribonucléique
ARN db	ARN double brin
ARN sb	ARN simple brin
ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine-5'-triphosphate
CHC	carcinome hépatocellulaire
CLDN1	claudine-1
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	cytomégalovirus
CR	complexe de réplication
CRE	<i>cis-acting replication element</i>

DAA	<i>direct acting antiviral</i>
DLS	<i>dimer linkage sequence</i>
DMS	<i>dimethyl sulfate</i>
eIF	<i>eukaryotic initiation factor</i>
EMCV	virus de l'encéphalomyocardite
GAG	glycosaminoglycane
GBV	virus GB
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GORS	<i>genome-scale ordered RNA structure</i>
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HTA	<i>host targeting antiviral</i>
HVR-1	<i>hypervariable region 1</i>
IFN	interféron
I κ B	<i>inhibitor of NF-κB</i>
I κ K	<i>IκB kinase</i>
I κ Ki	<i>inducible IκK</i>
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
IRF-3	<i>interferon regulator factor 3</i>
ISG	<i>IFN-stimulated gene</i>
ISGF3	<i>ISG factor 3</i>

ITAF	<i>IRES transacting factor</i>
LD	<i>lipid droplet</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LDL-R	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LT	lymphocyte T
LVP	lipoviroparticule
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling protein</i>
miR	<i>microRNA</i>
MLV	virus de la leucémie murine
NANBH	<i>non-A, non-B hepatitis virus</i>
NCR	<i>Non Coding Region</i>
Neo	gène de la néomycine transférase
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NK	<i>natural killer</i>
NMIA	<i>N-methylisotoic anhydride</i>
OCN	occludine
ORF	<i>open reading frame</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
pb	paire de bases
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>

PCBP2	<i>Poly(rC)-binding protein 2</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>
PKR	<i>protein kinase RNA-activated</i>
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
PTB	<i>« polypyrimidine tract-binding » protein</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RE	<i>réticulum endoplasmique</i>
RIG-1	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RMN	<i>résonance magnétique nucléaire</i>
RRE	<i>cis-acting rev reponse element</i>
RRL	<i>rabbit reticulocyte lysate</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RT-qPCR	<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SHAPE	<i>selective 2'-hydroxyl acylation with primer extension</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SL	<i>stem loop</i>
SOC3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
SRB1	<i>scavenger receptor class B member 1</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription proteins</i>

TAR	<i>“trans-acting response” element</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRIF	<i>TIR- domain-containing adaptor-inducing IFN-β</i>
uPA-SCID	souris immunodéficientes transgéniques exprimant l’activateur de l’urokinase plasminogène.
UV	ultraviolet
VHB	virus de l’hépatite B
VHC	virus de l’hépatite C
VHCcc	particules infectieuses du VHC en culture cellulaire
VHCpp	pseudoparticules du VHC
VHG	virus de l’hépatite G
VIH-1	virus de l’immunodéficiência humaine de type 1
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VLP	<i>virus-like particule</i>
VR	<i>variable region</i>
WHO	<i>world health organization</i>
WT	<i>Wild type</i>

À mes amis,

À ma famille,

À mes parents,

À la mémoire de ma grand-mère

Remerciements

En premier lieu, je remercie ma directrice de recherche, Dre Carolina Alfieri qui m'a permis de réaliser ma thèse dans son laboratoire. Mes remerciements vont aussi aux membres du laboratoire pour leur participation dans mes différents projets.

Je souhaite remercier les membres du jury pour avoir accepté de corriger mon travail, en particulier le Dr Eric Cohen pour agir en tant que président-rapporteur. Je suis flattée que le Dr Guy Lemay fasse également parti de mon comité de thèse. Je les remercie tous deux pour les conseils avisés, prodigués lors de mon examen de synthèse pré-doctoral. C'est un grand honneur que le Dr Matthias Götte ait accepté d'évaluer ma thèse en tant qu'examineur externe. Je le remercie de l'intérêt porté à mon travail.

Je tiens à remercier l'Université de Montréal, et en particulier le département de microbiologie et immunologie pour l'aide financière qu'ils m'ont consentie tout au long de mes cinq années de doctorat.

Je voudrais remercier le laboratoire du Dr Hervé Sartelet, pour m'avoir permis de réaliser de la microscopie électronique afin de visualiser les virus ER-1b dans les cellules infectées. Je remercie Lynda Abed pour son aimable collaboration.

Durant ces cinq années de doctorat, j'ai eu la chance d'apprendre à connaître Dre Natacha Mérindol, Doris G. Ransy et Ramatoulaye Bah. Natacha, merci pour toutes ces discussions scientifiques, merci de m'avoir aidée, écoutée, encouragée à suivre mes idées et d'avoir eu confiance en moi. Merci pour ton amitié. Doris, merci de m'avoir « remis sur les rails », d'avoir été ma deuxième tête, de m'avoir rappelé les « vraies » priorités. Merci pour tout et plus encore. Ma binôme Rama, merci de m'avoir accueillie, soutenue tout au long du doctorat. Merci pour tous ces fous rires qui rendent les difficultés surmontables. Merci d'avoir

toujours été là. Merci les filles pour tous les bons moments que nous avons partagés et d'avoir été ma famille à Montréal. « *You are amazing* ».

Je tiens à remercier la famille Boussarie Rey Gomez pour tout leur soutien et leur encouragement, merci à la famille en Or. Merci à Céline et Christophe Rey, « les poulets », pour m'avoir soutenue et relevée à chaque fois que je tombais. Merci Christophe pour avoir supporté les moments de folies que nous avons souvent partagés avec ta femme. Le déroulement de ma thèse, et ce qui l'a précédé, est loin d'avoir toujours été facile mais toutes les difficultés ont été allégées par le soutien de Céline. Merci pour ta disponibilité, ton soutien psychologique et ta patience. Merci de m'avoir aidé dans la rédaction de ma thèse en corrigeant mon français parfois approximatif. Merci de t'être démenée pour me permettre d'imprimer les 5 exemplaires de ma thèse dans un pays où le papier de format US letter n'existe pas. Merci d'avoir été plus qu'une amie. Merci mille fois.

Enfin je souhaite remercier toute ma famille, en particulier mon frère et mes parents pour leur soutien. Cette thèse est l'aboutissement de longues années d'études, durant lesquelles mes parents m'ont encouragée, suivie, soutenue même à 5000 km. J'ai eu la chance d'avoir des parents exceptionnels qui ont de suite embarqué lorsque j'ai annoncé que je ferai mon doctorat à Montréal et qui m'ont aussi apporté une aide précieuse lors de la rédaction de ma thèse. Merci pour tout.

Pour conclure, je remercie celles et ceux qui n'auraient pas été nommés dans ces remerciements par oubli de ma part, et les prie de m'en excuser.

Contributions

Article I (Chapitre 3). In situ localization of single- and double-strand RNA elements contained in the hepatitis C virus genome 3'-untranslated region. Elodie Rance, Jing Hu, Jerome E. Tanner and Caroline Alfieri. Dans cet article, j'ai étudié *in situ* la présence d'éléments ARN simple brin et double brin dans le 3'UTR du génome du VHC et ceci dans un contexte de génome entier. J'ai réalisé avec Jing Hu environ 50 % des expérimentations. J'ai analysé les données et interprété les résultats. Lors de l'écriture de l'article, j'ai donné mon avis et participé aux corrections du papier conjointement avec les coauteurs. Cet article est en phase finale de préparation et prévu d'être soumis dans la revue Nucleic Acids Research.

Article II (Chapitre 4). Long-Range interaction involving domain II of the 5'untranslated region and the viral polymerase coding sequence is necessary for efficient hepatitis C virus RNA replication. Elodie Rance, Jerome E. Tanner and Caroline Alfieri. Dans cet article, j'ai caractérisé l'existence d'une interaction ARN-ARN de longue distance entre le domaine II du 5'UTR et la région codante NS5B du génome du VHC. De plus, j'ai démontré que cette association des deux régions terminales du génome a un rôle dans le cycle viral du VHC. J'ai participé à l'élaboration du projet et réalisé toutes les expérimentations. J'ai analysé les données, interprété les résultats et écrit l'article avec l'aide de ma directrice de thèse. Cet article n'est pas encore soumis et sera encore corrigé.

Article III (Chapitre 5) publié dans Journal of Viral Hepatitis en février 2012 (19: e73–e80. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01505.x). Inhibition of Ikb kinase by thalidomide increases hepatitis C virus RNA replication. Elodie Rance, Jerome E. Tanner and Carolina Alfieri. Dans cet article, j'ai étudié l'effet d'une molécule immunomodulatrice, la thalidomide, sur la réplication du virus de l'hépatite C. J'ai réalisé plus de 90 % des expérimentations, en effectuant tous les Western-blot, les tests de cytotoxicité (MTT), les transfections, les infections et les traitements avec les différents inhibiteurs de la voie NF-kB dont la thalidomide. J'ai aussi quantifié l'ARN viral par RT-qPCR et l'expression du récepteur CD81 par FACS. J'ai analysé les données et interprété les résultats. J'ai aussi écrit la première version de l'article et participé aux corrections des différentes autres versions du papier conjointement avec les coauteurs.

Chapitre 1 : Introduction

I. L'HÉPATITE C

1. Historique

Dans les années 1970, il a été démontré qu'un agent infectieux causant la plupart des hépatites n'était ni le virus de l'hépatite A et ni le virus de l'hépatite B [1]. Ainsi ce virus était qualifié, d'hépatite « non-A, non-B » (NANBH) [2]. Des années plus tard, en 1989, des techniques de biologie moléculaire ont permis d'isoler le virus, rebaptisé virus de l'hépatite C (VHC) [3]. Une banque d'expression d'ADNc construite à partir de sérums de chimpanzés infectés a été criblée par des sérums de patients NANBH. Ceci a permis de caractériser le VHC comme étant un agent infectieux ayant un génome ARN simple brin (ARN sb) de polarité positive et de longueur d'environ 10 000 nucléotides [4].

2. Épidémiologie

Le VHC affecte environ 130 à 170 millions de personnes dans le monde (soit une prévalence de 2 à 3 %), avec 3 à 4 millions de nouveaux cas par an (WHO[5]). Chaque année, plus de 350 000 morts causées par des cirrhoses et des hépatocarcinomes (CHC) [6] sont attribuées à l'infection par le virus de l'hépatite C, faisant de ce virus un grave problème de santé publique.

La plus faible prévalence du VHC est retrouvée en Europe occidentale, Amérique du nord et en Australie ($\sim 2\%$) [7, 8], alors que ce taux est le plus fort ($\geq 3\%$) en Afrique, Europe orientale, Amérique latine ainsi qu'en Asie du sud [9, 10] (figure 1.1).

3. Histoire naturelle

Lors de l'infection par le VHC, une affection aiguë progresse dans 80 % des cas en hépatite chronique évoluant en cirrhose voire en carcinome hépatocellulaire [12].

Très rapidement après exposition, le VHC induit chez les patients une hépatite aiguë qui dure les six premiers mois de l'infection [13, 14]. Seulement 20 à 30 % des patients présentent des signes cliniques (fièvre, jaunisse, fatigue, nausées etc.) rendant souvent cette période de l'infection inaperçue [15]. On observe dès la 2^{ème} semaine jusqu'à deux mois post-infection, des niveaux élevés (taux maximal à 8 semaines) de l'enzyme alanine aminotransférase (ALT) révélant des dommages au foie [13]. Cette phase est caractérisée par une virémie positive et une sérologie négative. En effet l'ARN viral peut être détecté dans le sérum des patients une à deux semaines après l'infection (figure 1.2). En moyenne, 20 % des patients éliminent spontanément le virus le plus souvent dans les trois premiers mois post infection [15]. Les hépatites fulminantes sont observées mais sont très rares.

Chez environ 80 % des patients [15], l'hépatite aiguë évolue en hépatite chronique. Durant cette phase, la virémie est détectable pendant plus de 6 mois (figure 1.2) [13, 15]. Dans 90 % des cas la chronicité est asymptomatique et peut durer de 20 à 40 ans même si les patients manifestent un taux élevé d'ALT [13] et que des signes cliniques comme l'inflammation, la stéatose et la fibrose peuvent être détectés. Parmi les patients chroniquement infectés, 20 % développeront des cirrhoses [16] et 2 % des carcinomes hépatocellulaires [17].

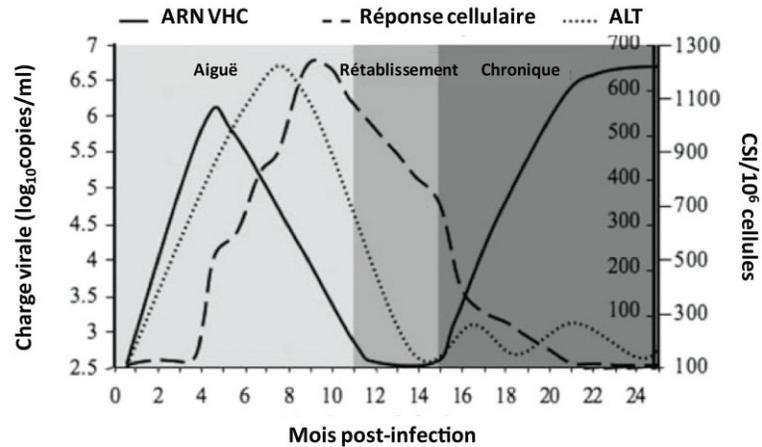


Figure 1.2 : Histoire naturelle de l'hépatite C (adaptée de Blackard et al. 2008).

L'infection de l'hépatite C est caractérisée par une phase aiguë (niveaux d'ALT et ARN viral élevés) qui progresse dans 80 % des cas vers un stade chronique. CSI : Cellules Sécrétrices d'Interféron ALT : Alanine aminotransférase [13].

4. Transmission

La transmission du VHC se fait principalement par voie parentérale [13]. Avant la mise au point de tests permettant de dépister le VHC, les dons de sang, les transfusions et les transplantations étaient les principaux modes de transmission.

Actuellement, dans le monde occidental la principale cause de transmission du VHC est la toxicomanie par voie intraveineuse. Au Canada, plus de 60 % des infections sont liées à la consommation de drogues injectables (Public Health Agency of Canada[11]). Cependant, dans les pays en développement, de mauvaises pratiques médicales seraient le principal risque de contamination. En effet, l'utilisation d'équipements mal stérilisés en Égypte, lors d'une

campagne de lutte contre un parasite dans les années 60 à 80, est la cause d'un taux d'infection le plus élevé au monde (22 %) [18].

Toutefois, d'autres modes de transmission ont été décrits. Des transmissions nosocomiales lors d'utilisation de matériels chirurgicaux ou dentaires mal stérilisés ont été rapportées. L'acupuncture, les piercings, les tatouages ainsi que les contacts sexuels sont des causes de transmission du VHC même si ce dernier mode de contamination est rare [13]. La transmission verticale, mère-enfant, est peu fréquente et se fait surtout lors de l'accouchement [12].

5. Immunité et évation virale

Les réponses immunitaires non spécifiques et adaptatives du système immunitaire, permettent à l'hôte de se protéger de pathogènes comme le VHC.

Immunité innée

Lors d'infection virale la réponse immunitaire non spécifique est induite en première ligne de défense, limitant la réplication et la propagation du virus [19]. Lors de l'infection par le VHC, les hépatocytes infectés et les cellules dendritiques plasmacytoïdes infiltrées dans le foie [20], produisent les interférons (IFN) de type I. Au niveau des cellules infectées, des récepteurs comme le récepteur endosomal TLR3 (toll-like receptor 3) et la protéine RIG-1 (retinoic acid inducible gene 1) [21] localisée dans le cytoplasme de la cellule, reconnaissent des domaines d'ARN double brin (ARN db) du VHC comme signature PAMP (pathogen-associated molecular pattern) [22]. Cette reconnaissance permet l'activation de voies de

signalisations impliquant des facteurs de transcription comme IRF-3 (Interferon regulatory factor 3) et NF- κ B (Nuclear factor κ B). Ceci induit la sécrétion d'interféron de type I et l'expression de certains gènes ISG (IFN-stimulated genes). L'activation de NF- κ B permet aussi d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, amplifiant la réaction inflammatoire et permettant le recrutement des leucocytes [22]. Afin de limiter la propagation du virus aux cellules voisines non infectées, les IFN sécrétés agissent par voie autocrine et paracrine en se liant à leurs récepteurs et activant la voie Jak-STAT [20]. Cette voie permet ensuite la transcription de plus de 300 gènes ISG [23] effecteurs de la réponse immunitaire contre l'infection du VHC (figure 1.3).

Le VHC utilise de nombreuses stratégies afin de contrecarrer la défense immunitaire liée à l'interféron. Ainsi le virus peut bloquer l'induction de l'IFN, interférer avec les signaux induits par l'IFN et inhiber l'action d'un ou plusieurs ISG [20]. Il a été montré que la protéase virale NS3/4 empêche l'activation d'IRF-3 et bloque l'expression de l'IFN- β en clivant des molécules adaptatrices comme MAVS [24] et TRIF [25] ayant un rôle central dans les voies de signalisation respectives de RIG-1 et TLR-3. Ceci entraîne la diminution de la production d'IFN de type I et la dérégulation de l'expression de cytokines/chimiokines par la perte d'activation de NF- κ B. Afin de supprimer la production d'IFN de type I, le VHC induit aussi l'autophagie [26] qui est un mécanisme de dégradation de macromolécules du cytoplasme des cellules eucaryotes. De plus, la protéine de la capsid Core est liée à la sur-expression d'un inhibiteur (SOC3) [27] de la voie Jack-STAT bloquant cette dernière et inhibant ainsi l'expression d'ISG. Une autre protéine virale, NS5A module la production d'IFN de type I via la protéine PKR. Des rapports contradictoires ont été publiés sur le rôle de PKR dans le contrôle de la réplication virale et certains groupes ont rapporté que la résistance du VHC aux IFN de type I est médiée par la suppression de l'activité de la kinase PKR par NS5A [28]

(figure 1.3). Ainsi la réponse à l'IFN dans la majorité des cas n'élimine pas le VHC suggérant que les IFN de type I sont insuffisants pour contrôler la réplication virale dans les hépatocytes infectés.

Les cellules NK (*Natural killer*) jouent également un rôle important dans la réponse innée face à l'infection du VHC. En effet ces cellules sont activées lors de la phase aiguë de la maladie en ayant notamment une augmentation de la production de l'IFN- γ et de leur pouvoir cytotoxique [29]. Cependant le VHC aurait aussi un effet inhibiteur sur les cellules NK via l'action des protéines virales NS5A [30] et E2 [31].

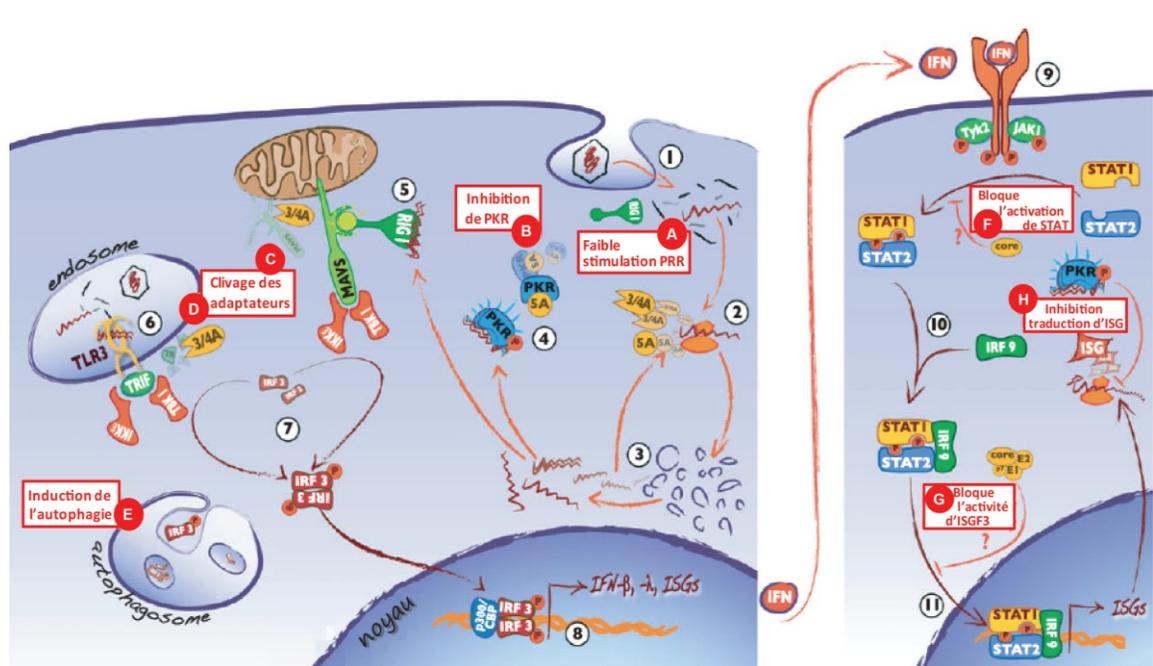


Figure 1.3 : Le VHC et la réponse immunitaire innée (adaptée de Thimme et al. 2012).

Lors de l'infection, le VHC entre dans la cellule (1), est décapSIDe et l'ARN génomique (+) est traduit produisant les protéines virales en grandes quantités incluant NS5A et la protéase NS3/4 (2). Les protéines non structurales virales forment le complexe de réplication permettant l'amplification de l'ARN génomique

dans le cytoplasme et exposant des intermédiaires ARN double brin (3). L'ARN nouvellement synthétisé peut soit servir d'ARN génomique dans l'assemblage de nouvelles particules virales, soit entrer de nouveau dans le cycle de réplication. Lors de la réponse immunitaire innée, les intermédiaires ARN double brin du génome du VHC peuvent être reconnus par des récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) comme PKR (4), RIG-1 (5) et TLR3 (Toll-like receptor) endosomal (6). RIG-1 se lie, active la protéine adaptatrice MAVS et active une voie de signalisation entraînant la phosphorylation et la relocalisation dans le noyau du facteur de transcription IRF3 (7), qui permettra la transcription des interférons de type I et III et de gènes ISG (8). **Le VHC utilise différents mécanismes afin d'inhiber la production d'interféron et d'échapper à la réponse immunitaire : lors de l'entrée du virus dans la cellule, la protéine RIG-1 reconnaît difficilement l'ARN génomique (A). Après la traduction virale, la protéine NS5A du VHC peut bloquer l'activation de la kinase PKR (B). La voie de signalisation IRF3 est inhibée par la protéase virale NS3/4 qui clive les protéines adaptatrices MAVS et TRIF (C, D). De plus, l'autophagie est détournée par le VHC pour dégrader des acteurs de la voie de signalisation IRF3 inhibant la production d'IFN de type I (E).** Une fois sécrété par la cellule infectée, l'IFN se lie et active son récepteur de surface soit sur la cellule infectée (autocrine), soit sur les cellules voisines (paracrine) (9) ce qui active la voie Jak-STAT menant à la formation d'ISGF3 (complexe trimérique de STAT1, STAT2 et IRF9) (10). La translocation de ce facteur de transcription dans le noyau (11) permet ensuite la transcription d'ISG qui seront traduits dans le cytoplasme en protéines effectrices antivirales. **Le VHC bloque aussi la voie Jak-STAT en inhibant la phosphorylation des protéines STAT (F) et en inhibant l'action d'ISGF3 (G). De plus la reconnaissance de l'intermédiaire ARN double brin par PKR (H) bloque la traduction d'ISG [20].**

Immunité adaptative

La réponse immunitaire adaptative joue un rôle central dans la pathogénèse et l'évolution de la maladie chez les patients infectés par le VHC [32]. L'immunité adaptative distingue deux réponses, les réponses immunitaires humorales et cellulaires.

La réponse humorale est caractérisée par la production d'anticorps spécifiques de l'agent infectieux. Les anticorps spécifiques du VHC sont détectables dans le sérum de personnes infectées plusieurs semaines après l'infection et ciblent les épitopes dans les protéines structurales et non structurales du VHC. Or seule une petite fraction des anticorps, appelés anticorps neutralisants, sont capables d'inhiber l'entrée du virus. Ces anticorps ciblent principalement la région hypervariable HVR-1 de la protéine d'enveloppe E2 virale [32]. Cependant, ces anticorps neutralisants ne sont pas efficaces dû à plusieurs mécanismes. La grande variabilité génétique du VHC, se traduit par l'apparition de mutations dans les épitopes du VHC qui ne sont plus reconnus par les anticorps neutralisants [33]. De plus, l'interaction des glycoprotéines virales avec les lipoprotéines de haute densité et le récepteur cellulaire SRB-I [34], ainsi que la présence de glycanes sur la protéine virale E2 [35], pourraient protéger le virus des anticorps neutralisants. Le VHC pourrait aussi échapper à la réponse humorale en se propageant de cellule à cellule [36].

La réponse cellulaire met en jeu deux types de lymphocytes T (LT) : les LT CD4⁺ et CD8⁺. Les LT CD8⁺ reconnaissent les antigènes viraux via la présentation antigénique par le CMH-I sur les cellules présentatrices d'antigène et sur les cellules infectées [20]. Leur pouvoir cytotoxique et leur sécrétion d'interféron gamma (IFN- γ) permet d'avoir une activité antivirale. Le rôle des cellules CD4⁺ est de sécréter des cytokines antivirales et d'activer les cellules B et LT CD8⁺ [20]. Les patients qui éliminent le VHC spontanément pendant la phase aiguë de l'infection ont une forte réponse immunitaire cellulaire qui cible de multiples épitopes dans différentes protéines du VHC [37, 38].

Les LT CD4⁺ spécifiques du VHC sont des régulateurs centraux et les LT CD8⁺ spécifiques du virus fonctionnent comme des effecteurs clés de la réponse immune adaptative. La réponse CD4⁺ est essentielle dans le contrôle de la virémie pendant la phase aiguë de

l'infection au VHC [39, 40]. En effet, sans une réponse efficace des LT CD4⁺, les LT CD8⁺ et les anticorps neutralisants ne contrôlent pas la virémie [41]. Les LT CD8⁺ spécifiques du virus ont un rôle dominant dans le contrôle de la réplication du VHC [42]. Ils exercent un fort effet antiviral par la production d'IFN- γ [20]. Cependant, l'existence d'une phase chronique de la maladie démontre que le virus, par de multiples stratégies, module et échappe à ces défenses.

Les mécanismes exacts expliquant l'échec de la réponse immunitaire cellulaire pendant l'infection chronique ne sont pas bien connus mais certaines pistes sont soupçonnées. L'apparition de mutants d'échappement de la réponse CD8⁺ due à la forte réplication virale (10^{12} virions par jour) [43] et au fort taux d'erreurs de la polymérase virale, faciliterait la persistance du VHC. Les mutations présentes dans les épitopes entraînent une diminution de la liaison du peptide avec le CMH-I. Elles peuvent interférer au niveau de la reconnaissance épitope-TCR des LT CD8⁺ [44]. En outre, cela peut empêcher la maturation du précurseur peptidique par le protéasome [45]. Le dysfonctionnement des LT CD8⁺ par leur incapacité à sécréter des cytokines antivirales comme l'IFN- γ ou de proliférer en réponse à un antigène, pourrait aussi expliquer la persistance virale [20]. Cela se manifeste notamment par l'épuisement immunitaire des LT CD8⁺ dû à l'activation continue de ces derniers par le virus, ainsi que par la perte de fonction des LT CD4⁺ auxiliaires et par l'action inhibitrice des LT régulateurs (LT reg) [20]. L'épuisement des LT CD8⁺ est caractérisé par la sur-expression de récepteurs inhibiteurs comme PD-1 [46] entraînant l'apoptose de ces dernières [47]. En effet, chez les patients infectés chroniquement les LT CD4⁺ sont fonctionnellement affaiblis [48] et les LT reg ont un rôle dans la suppression des LT spécifiques du virus supprimant la prolifération des LT CD8⁺ et leur sécrétion de l'IFN- γ [20]. Le micro environnement du foie peut aussi limiter l'activation et la fonction des cellules T CD8⁺ [20].

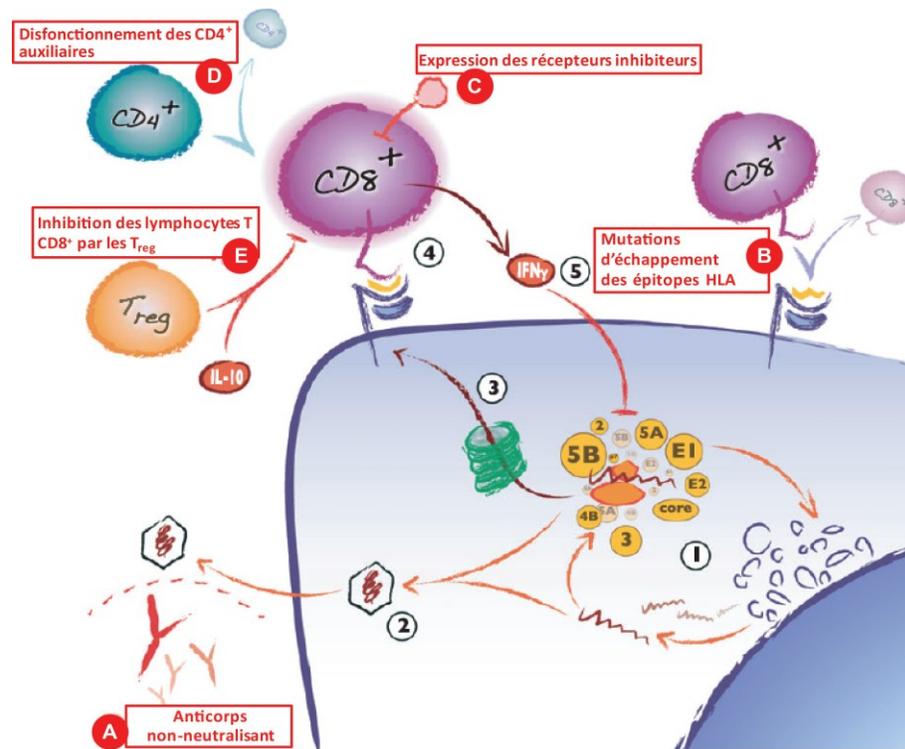


Figure 1.4 : Le VHC et la réponse immune adaptative (adaptée de Thimme et al. 2012).

L'ARN du VHC est répliqué au niveau des vésicules membranaires (1). Les protéines structurales et le génome s'assemblent pour former de nouvelles particules virales (2) qui sont ensuite relâchées. Les protéines virales peuvent être dégradées par le protéasome (3) et les peptides ainsi formés s'associent au CMH de classe I (4) puis sont présentés aux LT CD8⁺. Une fois activés les LT CD8⁺ sécrètent de l'IFN-γ qui bloque la réplication virale (5). **Différents mécanismes peuvent expliquer l'échec de la réponse humorale à lutter contre le VHC. L'un d'entre eux, met en cause l'évolution en quasi-espèces du VHC. Les anticorps neutralisants échouent ainsi à reconnaître les épitopes du virus (A). La réponse cellulaire est aussi tenue en échec. Des variants du VHC présentent des mutations au niveau des épitopes présentés aux LT CD8⁺ interférants au niveau de la reconnaissance de l'épitope par le TCR des LT CD8⁺ (B). Le dysfonctionnement des LT CD8⁺ peut aussi expliquer la persistance virale. La sur-expression des récepteurs inhibiteurs comme PD-1 sur les LT CD8⁺ (C) montre l'épuisement des cellules T. De plus, la faiblesse fonctionnelle des LT CD4⁺ auxiliaires pourrait jouer un rôle dans le dysfonctionnement des LT CD8⁺ (D). Tout comme les LT régulateurs qui inhibent l'action des LT CD8⁺(E) [20].**

6. Traitements contre l'hépatite C

À l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin contre le VHC [49]. Le traitement standard contre l'hépatite C est une combinaison d'interféron alfa pégylé et de ribavirine [50]. Récemment, l'efficacité du traitement a été augmentée de 50 % à 70 % lorsque la première génération d'inhibiteurs de protéase virale (Telaprevir ou Boceprevir) a été ajoutée [51, 52]. Cependant l'efficacité de cette nouvelle formule reste dépendante du génotype du VHC et des mutants de résistance apparaissent. Le traitement est coûteux, a de forts effets secondaires et ne peut pas être utilisé lors de la grossesse. Ceci souligne la nécessité de générer de nouveaux antiviraux. On parle d'antiviraux DAA (pour Direct Acting Antiviral) ciblant les protéines virales, et d'antiviraux HTA (pour Host Targeting Antiviral) inhibant la fonction de protéines cellulaires ayant un rôle dans le cycle viral du VHC.

Des inhibiteurs sont actuellement produits afin de bloquer l'entrée du virus dans la cellule hôte. Des anticorps neutralisants contre le VHC se sont avérés peu efficaces *in vivo* [53]. Cependant, des protéines comme les lectines [54] qui bloquent l'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe virale E2 et le récepteur cellulaire CD81 peuvent inhiber l'entrée du virus. De plus, dans l'optique de développer des HTA, des anticorps monoclonaux contre CD-81, SR-B1, CLDN1 (récepteurs cellulaires du VHC) ont été produits et sont efficaces indépendamment du génotype du VHC [55, 56]. De petites molécules agissant sur ces mêmes récepteurs, dont la plus avancée est ITX 5061 [57], sont préférées aux anticorps car elles sont moins chères.

Les protéines non structurales du virus sont aussi des cibles privilégiées. Les inhibiteurs de la protéase NS3/4 bloquent la réplication du VHC en empêchant la maturation de la polyprotéine virale. En 2011, des inhibiteurs de cette protéase ont été approuvés [51, 52].

Cependant, des inhibiteurs de protéases de seconde génération sont en cours de développement car ceux de première génération aggravent les effets secondaires de la combinaison Peg-IFN/RBV et ont une bonne efficacité uniquement sur le génotype 1 du virus. Des inhibiteurs ciblant l'autoprotéase NS2/3 [58] et l'hélicase NS3 sont aussi produits. Cependant, ceux ciblant l'hélicase ont une haute toxicité due à une spécificité limitée [59].

Les inhibiteurs de la polymérase virale NS5B sont de deux types : les analogues nucléosidiques et non-nucléosidiques [60]. Les analogues nucléosidiques comme le R1626 [61] sont incorporés dans l'ARN viral après avoir été transformés en nucléotides par la cellule et stoppent la synthèse de cet ARN. Les inhibiteurs non-nucléosidiques, comme le GS9190 [62], interfèrent quant à eux avec la polymérase en se liant à un site allostérique de NS5B.

La protéine NS4B qui induit la formation des vésicules membranaires du CR [63] est inhibée par le Clemizole. Ce dernier est intéressant car il inhibe à la fois la liaison de NS4B avec l'ARN viral et la réplication du génome du VHC [64].

Un premier inhibiteur de la protéine NS5A qui est impliquée dans la réplication de l'ARN virale et dans l'assemblage du virus, a été développé [65]. Les essais cliniques du Daclatasvir donnent des résultats très encourageants [66].

Afin de minimiser l'apparition de mutants de résistance, des molécules agissant sur les facteurs cellulaires participant à la réplication du VHC ont été synthétisées. La cyclophiline est une protéine cellulaire essentielle pour la réplication du VHC [67]. Ainsi, un analogue de la cyclosporine le Debio-025, qui interfère avec la fonction de la cyclophiline, a été développé pour inhiber la réplication virale [68].

De nouveaux inhibiteurs ont été produits afin d'empêcher l'assemblage du VHC. La protéine de la capsid (Core) joue un rôle important dans l'étape d'assemblage du VHC en se dimérisant et en s'associant aux gouttelettes lipidiques (LD : *Lipid Droplet*) [69]. Dans le but d'empêcher cela, une molécule a été développée afin d'inhiber la dimérisation de Core [70]. Les protéines cellulaires impliquées dans ce processus sont aussi de bons candidats pour la synthèse d'antiviraux. Par exemple un inhibiteur de la protéine DGAT1, obtenu pour d'autres raisons, a été testé comme antiviral potentiel du VHC en sachant que cette protéine a un rôle essentiel dans la localisation de Core avec les gouttelettes lipidiques [71].

Des oligonucléotides antiviraux ciblant l'ARN génomique du VHC ou le microARN 122 sont aussi développés. On trouve les siRNA [72], les antisens [73], les aptamères [74] et les désoxyribozymes ou DNAzymes [75]. Le microARN 122 est un activateur de la réplication et de la traduction du VHC [76, 77]. Récemment un antisens (SPC3649 ou miravirsin) a été produit inactivant miR-122 et diminuant la charge virale du VHC chez le chimpanzé [78]. Les inconvénients de ces oligonucléotides sont la difficulté de livrer ces derniers au site de l'infection et leur faible stabilité *in vivo*. Cependant récemment l'utilisation de nanoparticules comme transporteur a été démontrée comme étant une solution prometteuse [79, 80].

L'utilisation des antiviraux DAA en monothérapie peut mener à l'émergence rapide de mutants de résistance. C'est pour cela qu'il serait préférable de combiner différents DAA dans un futur traitement. Afin de contourner la haute variabilité génétique du VHC, l'approche ciblant les protéines cellulaires (HTA) semble prometteuse. Cependant, inhiber l'activité des facteurs cellulaires pourrait interférer avec la fonction naturelle de ces derniers et pourrait induire des effets non désirés.

Des traitements immunomodulateurs visant à induire une réponse immunitaire efficace sont aussi envisagés [81]. L'utilisation d'agonistes des TLR (Toll like recepteur) activant différentes voies de signalisation de l'immunité, est un exemple de cette approche. Le SM360320, agoniste du TLR7, a réduit *in vitro* la quantité d'ARN viral en induisant l'expression des interférons de type I [82]. Le développement de vaccin thérapeutique est aussi en cours et vise à stimuler la réponse immunitaire cellulaire de l'hôte contre le virus [81]. Pour cela, il y a l'utilisation de protéines seules, de virus recombinants ou de pseudo particules. L'IC41 est un exemple de vaccin composé de différents épitopes du VHC qui a des effets antiviraux significatifs [83].

L'obtention d'un vaccin prophylactique reste un défi car celui-ci doit pouvoir induire la production d'anticorps neutralisants et une réponse cellulaire efficaces. Le problème majeur d'un tel vaccin est la grande variabilité du VHC due à la faible fidélité de la polymérase virale et à la forte réplication du virus.

II. LE VIRUS DE L'HÉPATITE C

1. Classification et diversité génétique

Le virus de l'hépatite C est classé dans le genre des *hepacivirus* et dans la famille des *Flaviviridae* [3, 84]. Quatre genres composent cette famille : les *pestivirus* (ex : le virus de la diarrhée bovine, le virus de la peste porcine) [85], les *flavivirus* (ex : le virus de la fièvre jaune, le virus de la dengue) [86], l'*hepacivirus* représenté par le VHC [87] et les *pegivirus* qui est un nouveau genre comprenant le virus de l'hépatite G (VHG) et les virus GB (GBV-A, GBV-B, GBV-C) [88].

Le VHC infecte principalement les hépatocytes. Néanmoins, ce virus n'est pas strictement hépatotrope car *in vitro* le virus peut se répliquer dans des cellules neuroépithéliales [89] et de l'ARN génomique a été retrouvé dans certaines cellules mononucléées du sang périphérique [90]. Cependant des études *in vitro* ont démontré que les cellules du sang ne permettent pas la réplication de l'ARN du VHC [91]. La dépendance du virus à une série de facteurs cellulaires pour son entrée dans la cellule hôte contribuerait à expliquer le tropisme du VHC pour le foie. De plus, la protéine EWI-2wint qui est exprimée sur les cellules non-hépatiques, contribue au tropisme du VHC en bloquant l'entrée du virus dans les cellules non hépatiques [92]. Le métabolisme des lipides impliqué dans l'assemblage du VHC et actif dans les cellules hépatiques, pourrait aussi jouer un rôle dans le tropisme du VHC pour le foie [93].

Le VHC présente une grande variabilité génomique due à l'absence d'activité correctrice de son ARN polymérase ARN dépendante, ainsi qu'à une réplication intense du virus (10^{12} virions par jour [43]). En effet, le taux d'erreur de la polymérase est d'environ 10^{-3} substitutions nucléotidiques par génome et par an [94]. Le VHC est classé en sept génotypes distincts [95]. L'analyse phylogénétique des différents génotypes du VHC permet d'évaluer l'émergence et la diversification de ces derniers au cours du temps. Les génotypes auraient émergé il y a 500 à 2000 ans et auraient divergé en sous-types il y a 300 ans [96-98]. Ces génotypes diffèrent, les uns des autres, d'environ 30% dans leurs séquences nucléotidiques [99]. Dans un même génotype, les différents sous-types (plus de 100), différenciés par des lettres, ont un taux de variation de plus de 20% [98, 100] (figure 1.5). Le taux de mutations varie significativement suivant les différentes régions du génome. En effet, les régions non traduites du génome (le 5' et le 3'UTR) sont hautement conservées (plus de 90% d'identité) parmi tous les génotypes du VHC. D'autres parties, telles que les séquences codantes des protéines Core et NS5B sont aussi conservées [99]. Les plus hauts taux de mutations sont retrouvés dans les séquences codantes des deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 [101]. La grande variabilité génétique du virus conduit à son expansion sous forme de nombreux variants au sein d'un même individu : on parle de quasi-espèces [102].

Les génotypes et sous-types ont une distribution géographique mondiale variable. Les génotypes 1, 2 et 3 sont présents dans le monde entier, cependant leur prévalence varie d'une région à l'autre. Les génotypes 1a et 1b sont les génotypes les plus courants en Europe et en Amérique du nord. Le génotype 4 est répandu en Égypte et au Moyen-Orient alors que les génotypes 5 et 6 semblent se limiter à l'Afrique du sud et à l'Asie du sud-est (figure 1.6). Un 7^{ème} génotype a été identifié dans des populations d'Asie (notamment Vietnam) [95].

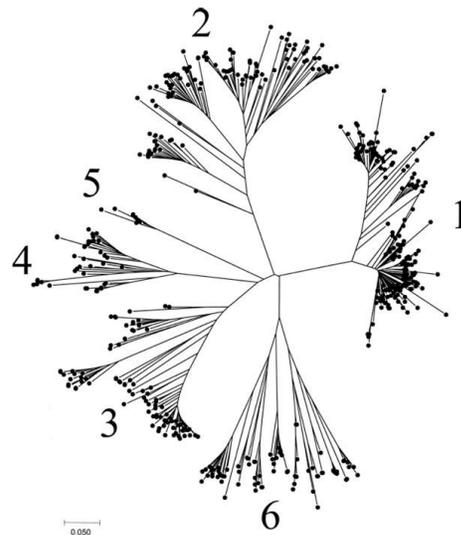


Figure 1.5 : Arbre phylogénétique (non-raciné) des 6 géotypes du VHC [98].

Cet arbre a été construit à partir de l'analyse nucléotidique d'une partie de la séquence codante de la protéine NS5B. Les branches majeures et mineures de l'arbre phylogénétique correspondent respectivement aux géotypes et aux sous-types du VHC.



Figure 1.6 : Distribution mondiale des géotypes du VHC (adaptée de Kamal 2006).

Les géotypes 1, 2 et 3 sont présents dans le monde entier. Les géotypes 4, 5, et 6 sont spécifiques de certaines régions comme le Moyen-Orient, l'Afrique du sud et à l'Asie du sud-est [103].

2. Caractéristiques générales du VHC

Le VHC est un virus enveloppé d'environ 40 à 70 nm de diamètre [104]. Il possède une nucléocapside de 30 à 53 nm de diamètre [105] qui est enveloppée d'une membrane de bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines virales E1 et E2. Sur la particule virale, ces deux protéines d'enveloppe s'assemblent en complexes stabilisés par des ponts disulfures [106]. La nucléocapside est composée de multiples copies de la protéine virale Core, formant une structure icosaédrique entourant l'ARN génomique [107] (figure 1.7). Les particules du VHC circulent sous des formes variées dans le sérum de patients infectés. Certains virus sont associés à des lipoprotéines de faible densité (LDL : *low-density lipoprotein*) ou de très faible densité (VLDL : *very low-density lipoprotein*) qui représentent la fraction infectieuse des virions. D'autres circulent liés à des immunoglobulines ou comme virions libres [108].

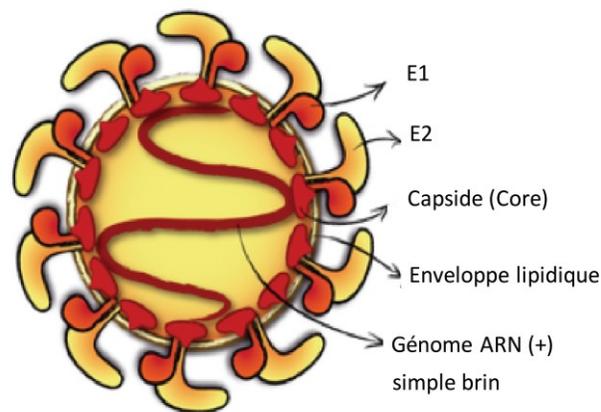


Figure 1.7 : Particule virale du virus de l'hépatite C (adaptée de Thimme et al. 2012).

Le virion du VHC est constitué d'une nucléocapside formée de la protéine Core entourant l'ARN génomique. La capside est entourée par une enveloppe de bicouche lipidique dans laquelle les glycoprotéines virales E1 et E2 sont ancrées. Cette particule virale possède aussi des protéines de la cellule hôte comme ApoE et ApoB [20].

Le génome du VHC est un ARN de polarité positive, monocaténaire, linéaire, non segmenté de 9600 bases [3]. Il contient un cadre ouvert de lecture codant pour une polyprotéine. La phase ouverte de lecture est flanquée de 2 régions terminales non traduites hautement conservées, le 5' et le 3'UTR (*Untranslated Region*). La séquence 3'UTR est indispensable à l'initiation de la réplication [109] et la région 5'UTR possède une structure importante pour l'initiation de la traduction du virus [110]. La traduction du VHC s'effectue de manière indépendante d'une coiffe. La région 5' non codante du génome est formée d'un domaine très structuré, l'IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*), capable de recruter directement le ribosome [111]. Ce dernier réalise ensuite la traduction de la polyprotéine qui est clivée par des protéases cellulaires et virales donnant les différentes protéines du virus (figure 1.8). Une protéine supplémentaire, la protéine F (*Frameshift*) ou ARFP (*Alternate Reading Frame Protein*) [112], a été identifiée. Elle est issue d'un cadre de lecture chevauchant la séquence codante de la protéine core.

Au niveau du 5'UTR, il y a présence de deux sites en tandem ciblés par le microARN : miR-122 [77, 113, 114]. Ce micro ARN spécifique du foie, est le plus abondant dans celui-ci [115]. Il se lie au 5'UTR du génome du VHC [116] et active la réplication et la traduction du virus [76, 77, 113, 114, 117]. Ainsi miR-122 pourrait contribuer à l'hépatotropisme du VHC. Il y a aussi la présence d'un site de liaison du miR-122 au niveau du 3'UTR du génome, cependant il ne semble pas être fonctionnellement important [77].

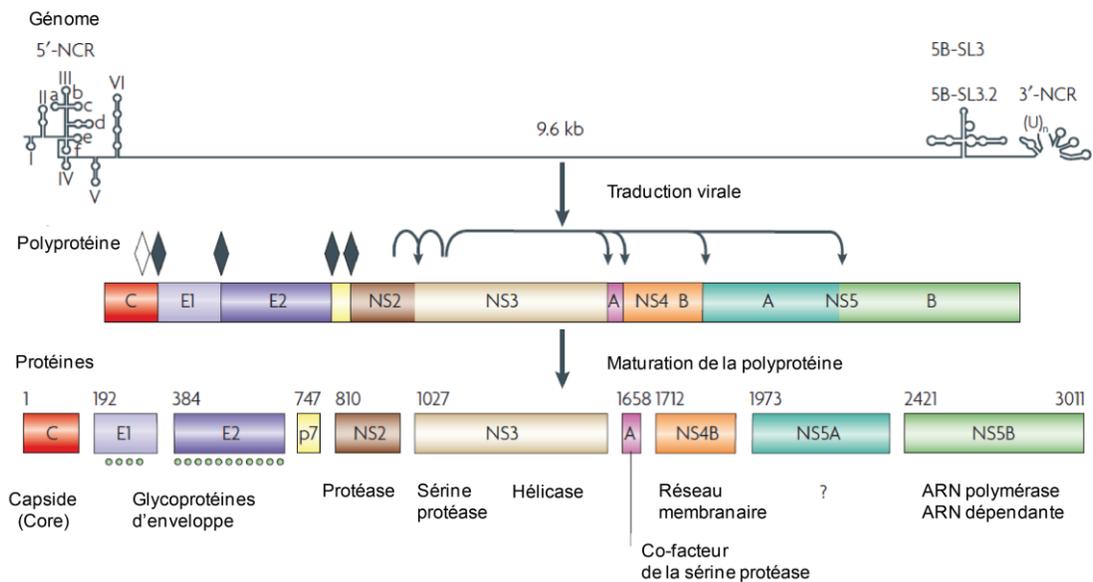


Figure 1.8 : Le génome et les protéines du VHC (adaptée Moradpour et al. 2007).

Le génome du virus de l'hépatite C est un ARN simple brin de polarité positive et de 9,6 kb. Il possède deux régions non codantes, le 5' et le 3' NCR (NCR : *Non Coding Region*), et un ORF codant pour une polyprotéine de 3011 acides aminés. L'IRES présent dans le 5'NCR permet l'initiation de la traduction de cet ORF indépendamment d'une coiffe. La polyprotéine obtenue subit une maturation donnant ainsi les protéines structurales et non structurales du VHC. Les diamants noirs indiquent les sites de clivages réalisés par les peptidases de réticulum endoplasmique (RE) et le blanc le site de maturation en C-terminal de la protéine Core. Les flèches montrent les sites de clivages réalisés par les protéases virales NS2/3 et NS3/4. Les ronds présents sous les protéines E1 et E2 indiquent leurs sites de glycosylations [118].

3. Protéines virales

La maturation de la polyprotéine obtenue lors de la traduction virale donne les différentes protéines du VHC. Ceci a lieu co- et post-traductionnellement au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Des signal-peptidases cellulaires au niveau du RE clivent les jonctions Core-E1, E1-E2, E2-p7 et p7-NS2. De plus, un clivage supplémentaire a lieu au niveau du C-terminal de la protéine Core par une signal-peptide peptidase permettant de supprimer la séquence signal de E1 [119, 120]. L'auto-protéase virale NS2/3 (protéase NS2 et le N-terminal de NS3) clive la jonction NS2-NS3 et les quatre autres jonctions sont clivées quant à elles par la sérine protéase virale NS3/4A [121] (figure 1.8 et 1.9).

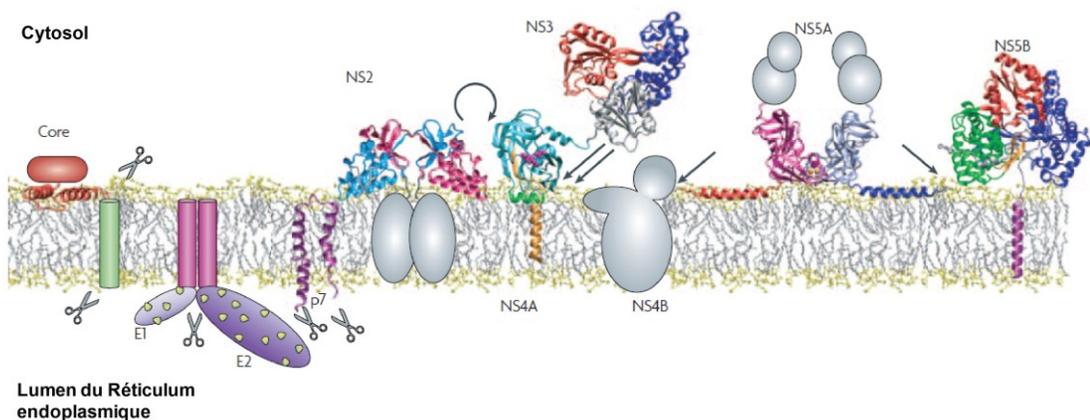


Figure 1.9 : Les protéines du VHC localisées à la membrane du RE (adaptée Moradpour et al 2007).

La polyprotéine du VHC est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et maturée en dix protéines ancrées ou associées à la membrane du RE. Les ciseaux indiquent les clivages réalisés par les peptidases du RE et la maturation de la protéine Core par une signal-peptide-peptidase dans le cytosol. La flèche circulaire montre le clivage par la protéase virale NS2/3 et les flèches droites les clivages par NS3/4 [118].

La protéine Core

La protéine de la nucléocapside virale Core est la première protéine structurale codée par le cadre ouvert de lecture du VHC. Core est clivée au niveau d'une séquence signal interne située entre Core et E1. Le clivage de la séquence signal par une peptidase donne une protéine Core immature de 191 acides aminés. Puis le C-terminal de Core subit une maturation supplémentaire par une peptidase qui donne la protéine mature de 21 kDa [122]. Cette maturation est nécessaire à la formation des particules virales infectieuses [123]. La protéine Core possède deux domaines, D1 et D2. Le domaine N-terminal hydrophile (D1) de la protéine Core contient un grand nombre d'acides aminés basiques, impliqués à la fois dans la liaison de la protéine avec l'ARN génomique et dans l'homo-oligomérisation de Core [118]. La protéine de la capsid est une protéine en hélice- α [124] qui est localisée sur les membranes du RE, dans les réseaux membranaires et sur la surface des gouttelettes lipidiques [122]. L'association avec des gouttelettes lipidiques est médiée par le domaine hydrophobe (D2) [124]. Core joue un rôle dans le recrutement des protéines non structurales et du CR au niveau des gouttelettes lipidiques. De plus l'association de ces dernières avec Core est essentielle pour la morphogénèse du VHC [125].

Les protéines ARF/F

Un cadre de lecture alternatif a été identifié dans le cadre +1 de la séquence codante de Core. Ce cadre alternatif code une protéine de 17 kDa, désignée ARFP ou protéine F [126]. La séquence codante d'ARFP est conservée parmi tous les génotypes du VHC [127]. Une forme tronquée de la protéine F, de 8 kDa, a son expression inversement proportionnelle à celle de la protéine Core [128]. Des anticorps spécifiques à ARFP ont été retrouvés chez des patients infectés montrant que cette protéine est exprimée au cours de l'infection par le VHC. Pourtant,

la protéine ARFP n'est pas nécessaire pour la réplication de l'ARN du VHC *in vitro* ou *in vivo* [129]. Les fonctions exactes de la protéine ARFP dans le cycle viral et la pathogenèse du VHC restent à élucider.

Les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2

Les protéines d'enveloppe E1 et E2 sont glycosylées et forment un complexe non covalent qui est une composante essentielle de l'enveloppe virale nécessaire à l'entrée du VHC dans la cellule cible [130]. La maturation et la conformation des glycoprotéines est un processus complexe qui implique une chaperone du RE et qui dépend de la formation de ponts disulfures, et des glycosylations de ces protéines. Les domaines transmembranaires d'E1 et E2, situés à leurs extrémités C-terminales, sont impliqués dans leur hétérodimérisation et ont des propriétés d'ancrage au RE [131]. Les glycosylations d'E1 et E2 ont lieu dans le RE et les domaines N-terminaux sont dirigés vers la lumière du RE [132]. E2 contient une région hypervariable d'environ 27 acides aminés appelée HVR1, qui permet au virus d'échapper au système immunitaire dû à sa grande variabilité [33]. La protéine E1 semble être impliquée dans le processus de fusion membranaire nécessaire à l'internalisation du virus dans la cellule hôte [133].

La viroporine P7

P7 est un polypeptide de 63 acides aminés. Cette protéine possède deux segments transmembranaires reliés par une petite boucle cytoplasmique. Les extrémités N-terminale et C-terminale sont orientées vers la lumière du RE [134]. P7 n'est pas nécessaire pour la réplication de l'ARN du VHC *in vitro*, mais est essentielle pour une infection productive *in vivo* [135]. Il a été rapporté que P7 forme des oligomères de 42 kDa avec une architecture en pétales

de fleur orientée vers la lumière du RE [136]. Cette protéine aurait une activité de canal cationique [137], suggérant qu'elle appartient à la famille des viroporines. Elle pourrait avoir un rôle important dans la maturation des particules virales et dans la relâche du VHC [138].

NS2 et la protéase NS2/3

La protéine NS2 est une protéine transmembranaire de 21-23 kDa. Le N-terminal de NS2 a été jugé essentiel pour la production de virus infectieux, peut être en jouant un rôle dans la morphogénèse du VHC [139].

La protéase NS2/3 est également connue sous le nom d'auto-protéase. Elle n'est pas indispensable pour la réplication de l'ARN *in vitro*, mais est essentielle pour le cycle viral [140]. L'activité catalytique de la protéase NS2/3 réside dans la moitié C-terminale de NS2 et le tiers N-terminal de la protéine NS3 [141]. La structure du domaine protéase de NS2 (NS2pro) a été obtenue et ce domaine forme un dimère ayant deux sites actifs. Après le clivage de la jonction NS2-NS3 par la protéase NS2/3, les extrémités C-terminales du dimère s'éloignent et l'activité protéasique est perdue [142].

La protéase NS3/4A

NS3 est une protéine multifonctionnelle, avec une sérine protéase située au un tiers de l'extrémité N-terminale et une hélicase ARN/NTPase située dans les deux tiers de la partie C-terminale de la protéine [143].

Le polypeptide NS4A fonctionne comme un cofacteur pour la sérine protéase NS3. Sa partie centrale constitue une partie intégrante du cœur enzymatique, et son domaine N-terminal est responsable de l'ancrage à la membrane du complexe NS3/4A [144]. La sérine protéase NS3/4A a été la première protéine ciblée pour la conception d'antiviraux [145]. Elle a une

poche de liaison au substrat peu profonde ce qui a posé un problème pour le développement d'inhibiteurs efficaces et spécifiques. Cette protéase clive et inactive deux protéines adaptatrices cruciales dans l'immunité innée (Trif [25] et MAVS [24]) ce qui permet au virus de contrecarrer l'immunité antivirale.

Le domaine C-terminal de NS3 a une activité hélicase et NTPase. Elle déroule des ARN double brins, ou des régions d'ARN simple brin avec des structures secondaires, en hydrolysant de l'ATP [118, 146]. L'activité hélicase est nécessaire à la réplication de l'ARN du VHC, probablement lors de l'initiation de la réplication en déroulant les structures secondaires du 3'UTR du génome. NS3 serait aussi impliquée dans l'assemblage de particules infectieuses [147].

La protéine NS4B

NS4B est une protéine hydrophobe de 27 kDa associée aux membranes du RE. Elle contient quatre segments transmembranaires et est palmitoylée au niveau de son domaine C-terminal [148]. Cette modification est importante pour son oligomérisation [148]. L'oligomérisation est requise à NS4B pour induire la formation du réseau membranaire qui est une altération spécifique de la membrane servant de structure pour le CR fonctionnel du VHC [149, 150].

La protéine NS5A

NS5A est une phosphoprotéine de 56-58 kDa ancrée dans la membrane du RE grâce à son extrémité N-terminale repliée en hélice α . Ce domaine est nécessaire à l'assemblage du CR de l'ARN et pourrait être impliqué dans les interactions protéine-protéine [151]. L'état de phosphorylation de NS5A module l'efficacité de la réplication de l'ARN virale [152]. NS5A est

composée de trois domaines distincts. Le domaine I, qui suit l'hélice α permettant l'ancrage à la membrane, a une structure dimérique et pourrait être impliqué dans l'interaction avec des protéines virales et cellulaires. Les autres régions de NS5A protégeraient l'ARN contre la dégradation par les ARNases cellulaires, ou contre la reconnaissance de l'ARN double-brin par les mécanismes de défenses antivirales. En effet, NS5A interagit avec l'ARN viral au niveau de la région riche en pyrimidine du 3'UTR(+) du génome [153]. NS5A joue aussi un rôle dans l'assemblage des virions. En effet, le domaine I permet la localisation de la protéine au niveau des gouttelettes lipidiques en interagissant avec Core [125]. Le domaine III est aussi important pour l'assemblage et la production de particules infectieuses [154].

La polymérase NS5B

NS5B est l'ARN polymérase ARN dépendante virale (RdRp). Cette enzyme possède une structure 3D en « main droite » caractéristique des polymérases [155]. Le site catalytique est représenté par la « paume de la main » et les domaines «pouce » et « doigts» forment un tunnel par lequel l'ARN simple brin est amené au site actif [156]. NS5B est ancrée dans la membrane du RE par son domaine transmembranaire en C-terminal. Cet ancrage est indispensable à la réplication du VHC [157]. L'activité de la polymérase est aussi modulée par des interactions avec les protéines virales NS3 et NS5A [158].

4. Cycle viral

Depuis la découverte du VHC, les études moléculaires réalisées ont permis de mieux comprendre les étapes du cycle viral, et plus particulièrement les étapes de traduction et de réplication de l'ARN viral. Cependant de nombreuses zones d'ombres persistent notamment dans les étapes précoces et tardives du cycle viral. Toutefois, les données obtenues jusqu'à ce jour permettent d'établir le cycle viral résumé dans la figure 1.10.

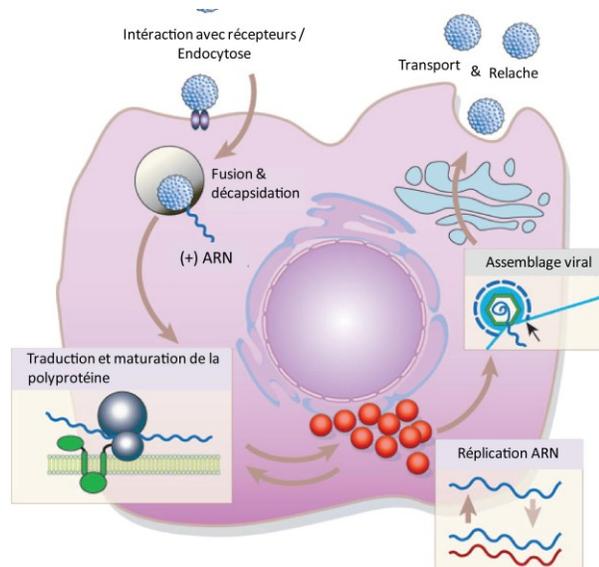


Figure 1.10 : Cycle de réplication du VHC (adaptée de Lindenbach and Rice 2005)

L'interaction du VHC avec la cellule se fait grâce à différents récepteurs. Le virus est d'abord endocyté, et sa nucléocapside est libérée dans le cytoplasme. Une fois la décapsidation réalisée, le génome viral ARN(+) est traduit, puis répliqué. Une partie des ARN(+) néoformés servent d'ARN génomique pour la formation de nouvelles particules virales. Le cycle se termine par l'assemblage du génome viral avec les protéines du VHC. Après maturation, les particules néoformées sont libérées [159].

Entrée du VHC dans la cellule hôte

Comme pour de nombreux virus, l'attachement du VHC à la surface des hépatocytes se fait d'abord de manière non spécifique et semble être médié par des glycoaminoglycanes (GAG) [160] et par le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLR : *Low-Density Lipoprotein Receptor*) [161]. Cependant, récemment il a été suggéré que l'interaction entre le VHC et le LDLR semble être impliquée dans une entrée non-productive qui peut potentiellement conduire à la dégradation de la particule virale [162] (figure 1.11).

Après la première fixation à la surface de la cellule, le virus se lie avec des facteurs d'entrée spécifiques. Il interagit d'abord avec le récepteur Scavenger de classe B et de type 1 (SRB1) [163] puis avec CD81 grâce aux glycoprotéines d'enveloppe virales. CD81 et SRB1 sont les premières protéines à avoir été identifiées comme facteurs d'entrée [164] [165]. CD81 est une protéine de la famille des tetraspanines impliquées dans un grand nombre de fonctions cellulaires et SRB1 est un récepteur à multiples ligands qui est le récepteur majeur des lipoprotéines à haute densité (HDL : *High-Density Lipoprotein*).

Le virus est ensuite relocalisé vers les jonctions cellulaires possédant les protéines claudine-1 (CLDN1) et occludine (OCLN) [166]. A l'heure actuelle, il n'existe aucune preuve indiquant que la particule virale interagit directement avec les protéines CLDN1 ou OCLN. Toutefois, il a été démontré que CLDN1 et CD81 peuvent interagir au niveau de la membrane plasmique, ce qui suggère que CLDN1 pourrait être un partenaire de CD81 comme récepteur du VHC [167]. Le rôle exact d'OCLN dans l'entrée du VHC reste à déterminer (figure 1.11).

Une fois localisé à la surface de la cellule, le virion est internalisé par endocytose médiée par les clathrines [168]. Après l'internalisation, le virion est transporté vers les endosomes précoces, où la fusion des membranes sous l'effet d'un pH acide [169] prend place [170]. Ceci permet la libération de la capsid du VHC dans le cytosol. Comme chez d'autres

virus, le VHC peut également se propager, au moins en culture cellulaire, par transfert direct de cellule à cellule [171].

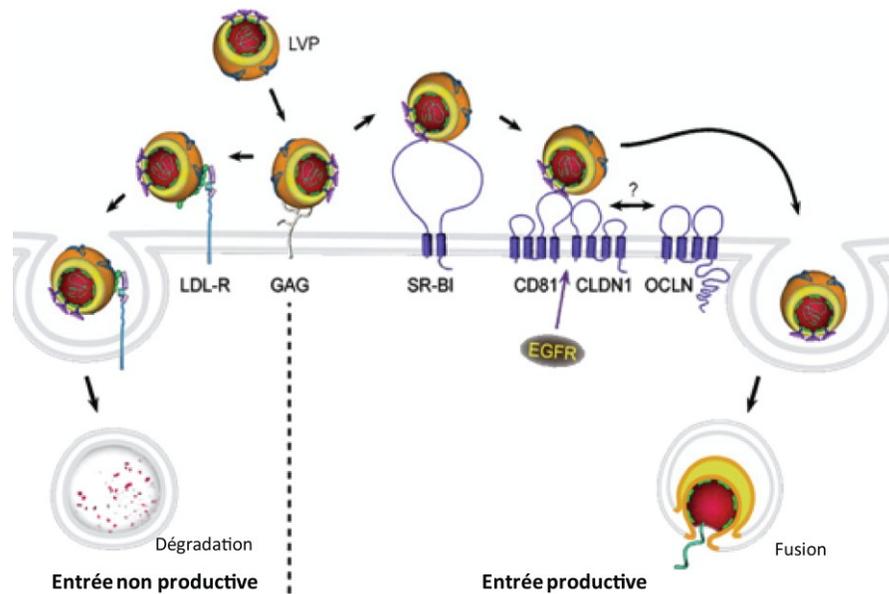


Figure 1.11 : Modèle de l'entrée du VHC dans la cellule hôte (adaptée Ploss and Dubuisson 2012).

La lipovirion se lie en premier lieu aux glycoaminoglycane (GAGs). Le virus peut ensuite suivre deux voies : la voie productive ou non productive. Dans la voie non productive, les lipoprotéines de la particule virale interagissent avec le récepteur LDL-R et le virion est rapidement internalisé et dégradé. La voie productive est un processus complexe impliquant un grand nombre de facteurs cellulaires incluant SRB1, CD81, CLDN-1 et OCLN ainsi que le récepteur de facteur de croissance épidermique, EGFR. Après la liaison à la cellule, la particule virale est internalisée par endocytose via les clathrines et la fusion a ensuite lieu au niveau des endosomes précoces [172].

Initiation de la traduction virale

Une fois la décapsidation réalisée, l'ARN génomique viral est libre dans le cytoplasme. L'ARN de polarité positive est pris en charge par la machinerie traductionnelle cellulaire puis traduit en une polyprotéine de 3011 acides aminés. Il est estimé que 1000 molécules de polyprotéines sont traduites par génome de VHC [5, 173].

Chez les eucaryotes, les ARN messagers sont traduits selon le modèle « scanning » [174]. Ce modèle implique que l'initiation de la traduction se fait par la reconnaissance de la coiffe (m7GpppN) dans le 5'UTR de l'ARNm. La coiffe sert de « balise » pour le recrutement de la sous unité ribosomale 40S [175] grâce à des protéines appelées facteurs d'initiation de la traduction eucaryotes (eIFs). Contrairement aux ARNm dans les cellules eucaryotes, la traduction du VHC s'effectue par un mécanisme dépendant d'un IRES [110] (Le rôle de la structure secondaire de l'IRES dans l'initiation de la traduction est décrit dans la partie IV).

Bien qu'un nombre limité de facteurs d'initiation canoniques de la traduction soit requis pour l'activité IRES, certaines protéines appelées ITAF (*IRES Trans-Acting Factors*) joueraient un rôle important dans cette traduction. Elles permettraient notamment de faciliter le recrutement de la machinerie traductionnelle ou de stabiliser la structure de l'IRES [176]. Toutes ces protéines ont des domaines multiples se liant à l'ARN. Des études ont montré que la protéine La (protéine humaine La autoantigène) stimule la traduction du VHC en interagissant avec une séquence proche de l'AUG initiateur de l'IRES [177, 178]. D'autres protéines comme les ribonucléoprotéines hétérogènes (hRNP) modulent la traduction du VHC. En effet, la hRNP D active la traduction du VHC en se liant au domaine II de l'IRES [179]. La protéine PTB (pyrimidine tract-binding protein), une autre hRNP, se lie au 5'UTR. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus en ce qui concerne son rôle dans la traduction du virus [180, 181].

Les microARN jouent aussi un rôle dans la traduction du VHC [113, 182]. En effet, miR-122 en se liant aux sites présents en 5'UTR stimule la traduction du VHC, possiblement en favorisant l'association des sous-unités ribosomales avec l'ARN virale à un stade précoce de l'initiation de la traduction [76, 113]. Une autre hypothèse est que miR-122 permettrait de stabiliser l'ARN viral [183]. Récemment deux autres microARN, miR-199a et miR-196 ont été identifiés comme inhibiteurs de la traduction du virus lorsqu'ils sont surexprimés [184, 185].

De plus, les protéines virales auraient un rôle dans la modulation de la traduction du VHC. Cependant les résultats obtenus sont controversés dus à la variété des systèmes rapporteurs utilisés [186].

Réplication de l'ARN viral

La traduction virale tout comme la réplication de l'ARN viral, utilisent comme matrice l'ARN de polarité positive, montrant qu'il existe un processus qui permet de passer d'une étape à l'autre dans le cycle viral. Cependant ce mécanisme n'est toujours pas connu.

Après la traduction, les protéines du VHC et certains facteurs cellulaires s'associent au niveau d'un réseau membranaire [187]. Ce dernier est issu d'une accumulation de vésicules membranaires dérivées du RE et de gouttelettes lipidiques. La formation de ce réseau est induite par la protéine non-structurale NS4B en combinaison avec NS5A [188]. Il a été montré que seule une petite fraction des protéines non structurales est associée au réseau membranaire réalisant la réplication [173, 189]. Le reste des protéines pourrait être utilisé pour contrecarrer le système immunitaire ou participer à la formation de virions infectieux [190]. Ainsi, le CR du

VHC se forme au niveau du réseau membranaire considéré comme un compartiment. Cette compartimentation permettrait de protéger l'ARN viral contre les défenses cellulaires lors de la réplication (figure 1.12). La machinerie de réplication ainsi formée permet de répliquer l'ARN génomique du VHC. La réplication commence par la synthèse d'un ARN complémentaire de polarité négative (ARN(-)) en utilisant le génome viral comme matrice. Ensuite, ce brin négatif sert de matrice pour la synthèse des brins positifs (ARN(+)) [191]. Ces deux étapes sont catalysées par l'ARN polymérase ARN dépendante du VHC (NS5B), qui initie la synthèse au niveau du 3'UTR du génome. Les ARN(+) sont transcrits 5 à 10 fois plus que les ARN(-) [173, 192] (L'implication des structures secondaires du 3'UTR(+) et (-) sera décrite dans la parti IV).

Différents facteurs régulent la réplication de l'ARN du VHC incluant les microARN [77] et les protéines cellulaires [193]. Les composants de la machinerie des ARN interférents incluant les complexes DICER et RISC [194] ainsi que le micro ARN miR-122 [77], sont requis pour une réplication fonctionnelle. D'autres facteurs cellulaires modulent la réplication du VHC. Il y a des protéines du cytosquelette comme l'actine, ACTN1 [193]. Un grand nombre de kinases interagissent avec NS5A, telles que PDK-1 [193] ou PI4KIIIa [195]. PI4KIIIa est recrutée au site de réplication via une interaction membranaire avec NS5A et semble contribuer à l'intégrité du CR [196]. Certaines protéines qui se lient directement à NS5A ou NS5B jouent un rôle essentiel dans la réplication [197]. Les protéines VAP-A et VAP-B localisées dans le RE et au niveau de l'appareil de Golgi en sont deux exemples et seraient impliquées dans la formation du CR fonctionnel [198, 199]. De plus, il a été montré que la cyclophiline A qui interagit directement avec NS5A a un rôle essentiel dans la réplication de l'ARN du VHC [200]. D'autres protéines, comme PTB qui se lie à l'ARN du VHC, participeraient aussi à la réplication virale [201]. Différentes équipes ont aussi rapporté que des protéines impliquées dans l'autophagie telles que Beclin-1 ou ATG5 faciliteraient l'initiation de la réplication de

l'ARN du VHC [202, 203]. De plus, ce processus cellulaire pourrait aussi contribuer à l'assemblage des particules virales [204, 205].

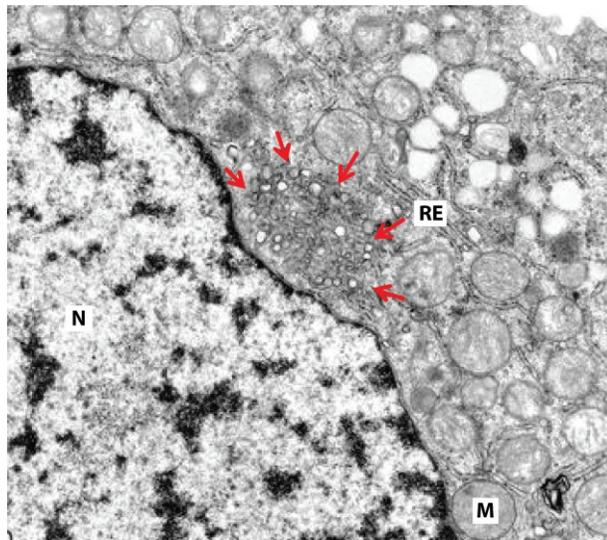


Figure 1.12 : Complexe de réplication du VHC.

Cette photo de microscopie électronique montre l'altération membranaire des cellules Huh-7 ayant le réplicon subgénomique du VHC. Les flèches rouges indiquent le réseau membranaire où est localisée la réplication de l'ARN du VHC. Ce réseau membranaire est issu du réticulum endoplasmique et de gouttelettes lipidiques d'après Gosert et al. 2003 [187]. M : Mitochondrie, N : Noyau et RE : Réticulum Endoplasmique.

Assemblage du virus de l'hépatite C

Une partie des ARN(+) nouvellement synthétisés vont servir de génome aux nouveaux virions lors de l'étape de l'assemblage. Ces virus seront ensuite relâchés dans le milieu extracellulaire par la voie de sécrétion.

Le processus d'assemblage du VHC est l'étape du cycle viral la moins bien comprise. La morphogénèse du virus souligne la particularité du double rôle des protéines non-structurales à la fois dans la réplication et l'assemblage du virus. L'étape d'assemblage du VHC est étroitement connectée au métabolisme des lipides [206]. En effet, les protéines structurales et non structurales du VHC interagissent avec des composants du métabolisme des lipides à des niveaux différents. Lors de l'infection par le VHC, il y a un profond changement dans la distribution intracellulaire des gouttelettes lipidiques [207]. Ces dernières semblent jouer un rôle central dans l'assemblage du VHC puisque toutes les protéines virales ainsi que le génome viral sont accumulés à proximité de ces organelles [208]. La protéine de capsid Core interagit directement avec les gouttelettes lipidiques [69] et permet leur relocalisation [209]. En plus de la protéine de capsid, certaines protéines non structurales virales comme NS3 et NS5A ont également été trouvées autour des gouttelettes lipidiques dans les cellules infectées par le VHC [210]. La protéine NS5A apparaît comme un acteur central dans la transition entre la réplication et l'assemblage. En effet, un modèle propose que NS5A soit maintenue dans la fonction de réplication grâce à l'association avec des facteurs cellulaires, mais se dissocie lors de phosphorylations, ce qui conduit à l'assemblage des particules virales [211]. Outre les protéines structurales virales et les composants du CR, les autres protéines du VHC, P7 et NS2, sont également essentielles pour la morphogénèse du VHC [139].

Popescu et al., ont proposé le modèle de la morphogénèse du VHC suivant. Suite à l'accumulation de tous les composants viraux près des gouttelettes lipidiques, l'assemblage du virion peut commencer. Ce processus peut être divisé en trois étapes : la formation de la nucléocapside, le bourgeonnement et la maturation de la particule infectieuse [212]. Trois éléments sont impliqués : la protéine Core, le complexe NS2 (comprenant NS2, les protéines d'enveloppe E1E2, P7 et probablement NS3) et le CR. Le complexe NS2 et celui de réplication se rejoignent. Ensuite la protéine Core induit la relocalisation des gouttelettes lipidiques créant un environnement favorable à l'assemblage. Puis le bourgeonnement viral est induit par la formation de la nucléocapside, par la formation de l'enveloppe par les glycoprotéines virales, et par l'accumulation de lipides au niveau du RE. Ceci permet la formation d'une lipoviroparticule hybride qui est ensuite maturée [208]. Au final, le virion a une composition lipidique *VLDL-like* et est associé à la protéine ApoE, ce qui est essentiel pour l'assemblage d'un virus infectieux [213] (figure 1. 13).

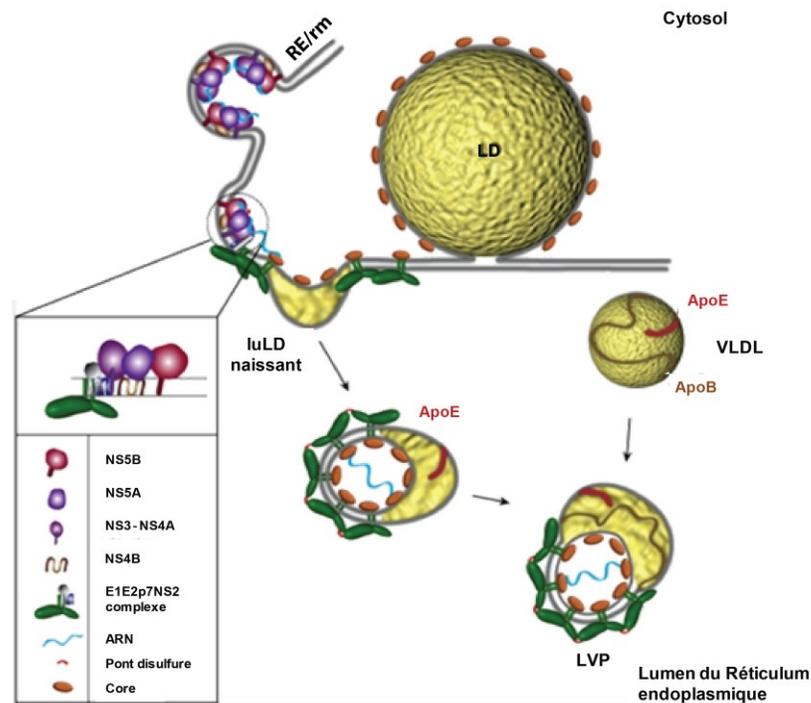


Figure 1.13 : Modèle de l'assemblage du VHC (adaptée de Popescu et al. 2011).

L'assemblage viral est déclenché par la rencontre de Core, du complexe E1-E2-p7-NS2 et du complexe de réplication. Le site de l'assemblage a lieu dans un microenvironnement de gouttelettes lipidiques (LD) et de réticulum endoplasmique (RE). Trois forces conduisent au bourgeonnement viral : la nucléocapside naissante, les protéines d'enveloppe qui pourraient stabiliser l'architecture de la surface virale par des ponts disulfures intermoléculaires et les gouttelettes lipidiques lumineales naissantes (luLD). Le résultat est une lipoviroparticule (LVP) hybride qui acquiert les protéines ApoE et ApoB. RE/rm est pour RE/réseau membranaire (lieu de la réplication de l'ARN viral) [208].

III. LES MODÈLES D'ÉTUDE DU VHC

Pendant longtemps, l'étude du cycle viral du VHC et de sa pathogenèse était compliquée dû au manque de systèmes de culture cellulaire efficaces et de modèles animaux. Néanmoins depuis la découverte du VHC, d'importants progrès ont été réalisés en utilisant de nombreux modèles [214, 215]. Ceci a permis l'étude de certaines étapes du cycle viral comme l'entrée, la réplication et la traduction. En 2005, une étape importante a été la production de particules infectieuses recombinantes du VHC en culture cellulaire (VHCcc) [104]. Ceci a permis l'étude d'étapes du cycle viral du VHC non explorées jusque là.

1. Modèles cellulaires *in vitro*

Les virus *like*-particules (VLP) et les pseudo-particules du VHC (VHCpp)

En l'absence de modèles suffisants et afin d'étudier l'entrée du VHC dans la cellule hôte, deux stratégies ont été mises en place : les virus *like*-particules (VLP) et les pseudo-particules infectieuses du VHC (VHCpp).

Les VLP sont produits dans des cellules d'insectes qui sont infectées par un baculovirus recombinant codant les protéines structurales core, E1 et E2 [216]. Ces dernières s'auto-assemblent en VLP qui ne possèdent pas de génome du VHC, empêchant ainsi la réplication de ces particules [217]. Les particules ont des caractéristiques morphologiques similaires à celles isolées à partir de sérums de patients [216, 218]. Cependant, l'utilisation de ce modèle se limite à l'attachement et à l'interaction virus-hôte due à l'absence de marqueurs intégrés dans le génome qui permettraient d'étudier les étapes en aval.

Les pseudo-particules du VHC, ou VHCpp, sont des virus constitués des protéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC, de la capside du virus de la leucémie murine (MLV) ou du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ainsi que d'un gène rapporteur [215]. L'infection des cellules cibles est détectée et quantifiée par la mesure de l'expression du gène rapporteur (GFP ou luciférase). Bien que ce modèle donne plus d'informations que les VLP, il permet seulement d'étudier l'entrée du VHC.

Le système réplicon

Pendant de nombreuses années, la recherche sur le VHC a été entravée par la faible efficacité des modèles qui étaient présents. Ainsi, la mise en place d'un système réplicon pour le VHC en 1999 a été une étape importante dans la recherche sur ce virus [214]. Le réplicon subgénomique utilise un génotype particulier du VHC, le génotype 1b, appelé Con-1. Dans ce système, la région codant pour les protéines structurales a été remplacée par le gène « Néo » de la néomycine phosphotransférase, entraînant la résistance de la cellule au G418. L'expression des protéines non structurales est dirigée par l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) présent en aval du gène « Néo ». Après sa transfection dans la lignée cellulaire humaine Huh-7, issue d'un carcinome hépatocellulaire, des colonies résistantes au G418 contiennent cet ARN bicistronique capable de se répliquer de manière autonome (figure 1.14). Un des dérivés du système réplicon contenant le génome entier du VHC est aussi capable de se répliquer sous pression sélective dans les cellules (figure 1.14). Cependant, ce réplicon génomique ne permet pas la production de virions infectieux. Il a été identifié des mutations adaptatives sur ces réplicons en culture cellulaire. Elles augmentent significativement le taux de réplication de l'ARN présent dans ces cellules [219]. Ces mutations ont été retrouvées dans NS3, NS4B et NS5A [158]. Cependant les mutations adaptatives seraient délétères pour

l'assemblage et la production de virus [220, 221]. Avec le système réplicon, il a été possible, pour la première fois, d'étudier la réplication et la traduction du VHC *in vitro*. L'étude d'aspects structurels du CR, des interactions virus-hôte ainsi que le développement d'agents antiviraux ont pu aussi être réalisés.

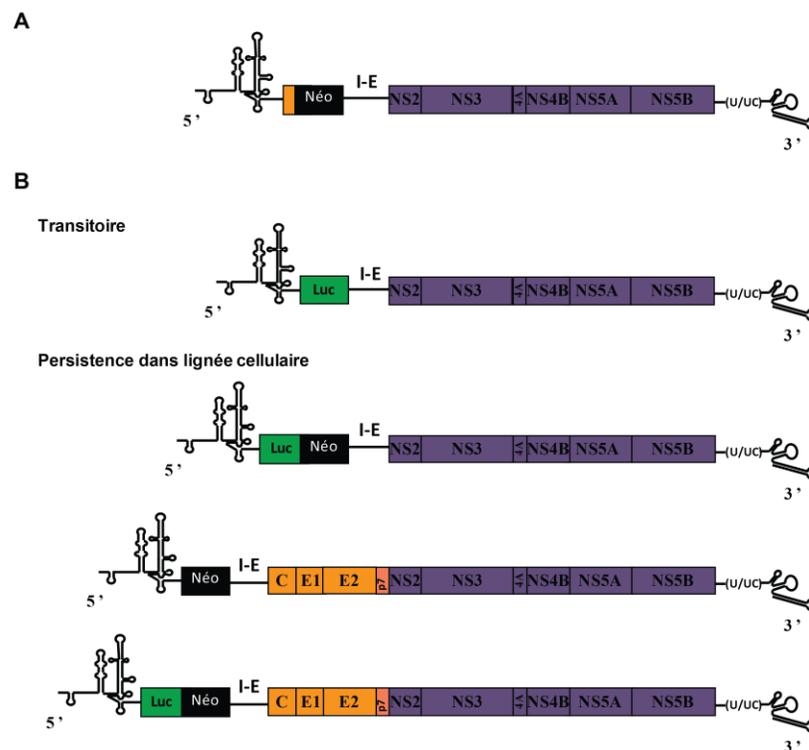


Figure 1.14 : Organisation du système réplicon et de certains de ses dérivés.

A) Le système réplicon. Il est formé du 5'UTR, d'une partie de la séquence codante de Core du VHC accolée au gène de résistance à un antibiotique (Néo : gène de la néomycine transférase), suivi de l'IRES de l'EMCV (I-E) puis de la région codante des protéines structurales (NS3-NS5B) et du 3'UTR du VHC. B) Différents dérivés de ce réplicon ont été construits. Ce sont des réplicons subgénomiques (possédant une partie du génome du VHC : les deux du haut) ou génomiques (ayant tout le génome du VHC : les deux du bas) qui ont ou non des gènes rapporteurs comme la luciférase (Luc). La construction du haut est utilisée pour des essais transitoires car elle ne possède pas de gène de sélection lui permettant d'être maintenue dans la cellule.

Particules infectieuses en culture cellulaire (VHCcc)

Le système réplicon a révolutionné la recherche sur la réplication du VHC. Toutefois, les étapes précoces et tardives de l'infection ne pouvaient pas être analysées. Dans ce contexte, en 2005 Wakita et al. ont généré un réplicon de génotype 2a (JFH-1) qui a été isolé à partir d'un sérum de patient ayant une hépatite C fulminante [222]. Ce modèle peut se répliquer de façon très efficace et dans différents types cellulaires sans pression sélective. Il permet, de plus, la production de virions infectieux en culture cellulaire et a été appelé VHCcc [104, 223, 224]. Afin d'améliorer l'infectiosité de ce système, des constructions chimériques ont été construites [225]. Toutefois, des critiques ont été émises à l'encontre de ce système car il ne représente qu'un seul type de génotype (2a). Pour répondre à cette critique, des chimères appelées inter-génotypiques [225] ont été construites. La séquence codante des protéines structurales a ainsi un génotype différent du JFH1, ce qui permet l'étude de l'entrée du VHC pour ses différents génotypes. Ainsi, l'obtention de ce modèle de VHC infectieux en culture cellulaire est une étape majeure pour l'analyse détaillée du cycle viral du VHC.

Cependant, les systèmes réplicatifs représentant les génotypes et sous-types thérapeutiques pertinents du VHC sont toujours manquants [226] même si des efforts sont actuellement réalisés [226-228].

2. Modèles animaux

Le meilleur modèle animal établi pour étudier l'infection du VHC et les maladies du foie liées est le chimpanzé [2]. Son infection par le VHC a une progression similaire à celle observée chez l'homme [229]. Mais, compte tenu de la disponibilité limitée de ces animaux, du coût et des aspects éthiques, des modèles de petits animaux ont été développés. Des expériences ont été réalisées chez d'autres primates comme le marmouset [230] et le tamarin [231]. À ce jour, le tupaïa qui est un petit rongeur génétiquement proche des primates, est le seul modèle qui a pu être infecté par le VHC [232]. Cependant la persistance de l'infection n'a pas pu être établie. Plus récemment, il y a eu l'utilisation de souris immunodéficientes. Les souris uPA-SCID sont des souris immunodéficientes transgéniques exprimant l'activateur de l'urokinase plasminogène (uPA) qui conduit à la destruction de leur foie. Ceci permet la transplantation d'hépatocytes humains qui vont recoloniser le foie détruit. Il est ensuite possible d'infecter avec le VHC [233]. Toutefois ce modèle murin est très difficile à mettre en place et il y a une grande mortalité chez ces souris. Un autre système utilise aussi des souris immunodéficientes pour permettre une xénogreffe. Les cellules greffées sont dérivées d'une lignée d'hépatocarcinome (Huh-7) qui est permissive au VHCcc, JFH1 [234]. L'inconvénient de ces souris est qu'elles développent rapidement d'importantes tumeurs et doivent être sacrifiées empêchant le suivi de l'infection à long terme. Des efforts ont aussi été faits avec d'autres souris et petits animaux pour développer des modèles d'infection et de pathogénèses induites par le VHC [235].

IV. STRUCTURES ET FONCTIONS DE L'ARN GÉNOMIQUE DU VHC

La recherche dans le domaine des ARN non codants depuis plus d'une vingtaine d'années a changé notre vision dans la façon dont certains processus cellulaires seraient régulés. L'ARN peut ainsi être à la fois porteur de l'information génétique comme l'ADN mais aussi acteur dans certaines fonctions biologiques [236]. Ces petits ARN non codants sont des molécules qui agissent soit en trans [237, 238] soit en cis [239-241] pour réguler certains processus.

Les ARN interférents sont des exemples d'ARN régulant l'expression génique en trans. Il en existe deux types, les «siRNA» [237] et les «miRNA» (microARN) [238] qui ont la même fonction : réguler l'expression des gènes ciblés. Les siRNA ont une origine exogène [237]. En 1998, il a été montré que l'on pouvait réduire spécifiquement l'expression de protéines du nématode *C. elegans* en introduisant de l'ARN double brin capable de se lier à l'ARN messager cible [242]. Les microARN, quant à eux, ont une origine endogène car ce sont des petits ARN non codant provenant du génome [238]. Le premier micro ARN a été identifié dans les années 90 chez le nématode *C. elegans* [243]. D'autres ont ensuite été découverts chez les animaux et les plantes [238, 244].

Certains ARN non codant comme les ribozymes sont des ARN très structurés qui ont une activité catalytique [241, 245] et agissent soit en cis soit en trans. Il en existe deux groupes. Les ribozymes de grande taille forment le premier groupe. Il est représenté par la RNase P et les introns de groupe I et II. Les introns de groupe I et II sont présents dans les organelles des plantes et des eucaryotes inférieurs ainsi que chez les procaryotes [246]. La RNase P, quant à elle, est un enzyme constitué d'une protéine et d'un ARN qui est impliqué dans la maturation

des précurseurs des ARN de transferts [245, 247]. Le second groupe, les ribozymes de petite taille, est représenté par les ARN auto-clivables qui, comme leur nom l'indique se clivent eux mêmes [248]. Il y a notamment les ribozymes « *hammerhead* » (présents chez des pathogènes de plantes) [248] et les ribozymes en « *hairpin* » (présents dans certains virus satellites pathogènes de plantes) [248]. Le virus de l'hépatite delta, autre exemple de ribozyme autoclivable, est un virus satellite du virus de l'hépatite B [249, 250].

Il existe d'autres éléments ARN, appelés « *riboswitches* », qui régulent certains processus cellulaires des bactéries. Ces structures ARN sont retrouvées dans le 5'UTR des ARNm et agissent en cis pour réguler leur transcription ou leur traduction. Cette régulation de l'expression génique se fait en réponse à la liaison d'un ligand (métabolite, protéines, etc..) au niveau de cette structure ARN, entraînant une modification structurelle de cet élément [239]. Un seul « riboswitch » a été identifié à la fois chez les eubactéries, les archaeobactéries et les eucaryotes [240, 251].

Ces éléments ARN régulateurs ne sont pas exclusivement retrouvés chez les bactéries et certains eucaryotes. En effet, certains génomes ARN de virus possèdent des domaines structurés qui agissent en cis pour réguler le cycle de réplication viral.

1. Les structures ARN agissant en cis : « *cis-acting elements* »

1.1 Les « *cis-acting elements* » de virus à ARN génomique

La grande majorité des virus de plantes et d'animaux ont un génome ARN. Les virus à ARN simple brin de polarité positive ou négative et les virus à ARN double brin en sont les trois grands groupes dominants. De ces trois groupes, les virus à ARN de polarité positive sont les plus répandus avec notamment les *Flaviviridae* et les *Picornaviridae* [252]. Ces ARN génomiques viraux forment des structures secondaires qui jouent un rôle dans la régulation du cycle de réplication viral [252]. Ces structures ARN qui sont principalement retrouvées dans les régions non traduites du génome, ont été appelées « *cis-acting elements* » ou éléments ARN agissant en cis. Ainsi différentes régions ARN très structurées du génome viral sont impliquées par exemple dans l'initiation de la traduction [253], de la réplication [252] et de l'encapsidation du génome viral [254].

Les IRES pour «Internal Ribosomal Entry Site »

Certains génomes viraux possèdent un IRES qui est un élément ARN composé de structures complexes à multi-domaines. Ce motif structural permet le recrutement du ribosome lors de l'initiation de la traduction virale [255-257]. Les premiers IRES ont été découverts en 1988 [253, 258]. Il a été démontré que la traduction de l'ARNm non coiffé de deux virus, le poliovirus et le virus de l'encéphalomyocardite (*Picornaviridae*) se faisait grâce à une structure ARN permettant l'assemblage de la machinerie traductionnelle [175, 259, 260]. Après avoir identifié les premiers IRES viraux en 1988, il a été montré par Sarnow et al. (1989) [261] que la traduction dépendante de l'IRES pouvait être utilisée par les ARNm cellulaires eucaryotes [175, 262].

Les IRES viraux diffèrent pour le recrutement des facteurs d'initiation canoniques et non canoniques. Ces derniers appelés IRES trans-acting factors (ITAF) permettent la liaison du complexe d'initiation 43S sur l'IRES viral en aidant ce dernier à se mettre dans une conformation requise pour la traduction [262]. Il existe quatre groupes d'IRES classés selon certaines caractéristiques comme la structure secondaire, la localisation du codon initiateur, le recrutement de facteurs cellulaires et la capacité de l'IRES à initier la traduction *in vitro* en RRL (dans l'extrait de réticulocyte de lapin) [263]. Les IRES viraux de type I recrutent directement le ribosome. Le virus paralysant le criquet [264] ou le virus du syndrome de Taura [265], virus de la familles des *Dicistroviridae* (ARN+), sont deux exemples qui en possèdent un dans leur génome. Pour les IRES de type II (le VHC et le virus de la fièvre porcine, *Flaviviridae*) et III (le virus de la fièvre aphteuse [266] et l'EMCV [258], *Picornaviridae*), l'initiation de la traduction a lieu comme le type I mais cela requière des facteurs d'initiations eucaryotes (eIF) et d'autres facteurs cellulaires. Les IRES de type IV (Poliovirus, *Picornaviridae* [253]) exigent aussi la présence de facteurs cellulaires mais ont une faible efficacité en traduction *in vitro* [262, 263]. Il existe d'autres classifications réalisées suivant d'autres critères [252]. Tous les virus cités sont des exemples et représentent une liste non exhaustive de virus possédant un IRES.

Les éléments CRE pour « Cis-acting Replication Elements »

Il existe des éléments ARN présents à différentes positions dans le génome viral qui sont impliqués dans l'initiation de la réplication de l'ARN viral ou dans la régulation de ce processus. Ces structures régulatrices sont appelées éléments CRE pour «*cis-acting replication elements*» [267, 268].

Chez les *Picornaviridae*, le 3'UTR de l'ARN génomique nommé aussi *oriR* est une région hautement structurée. Pour le poliovirus cette région est formée de deux structures tige-boucles et d'une séquence poly-adénylée. Ces virus à ARN simple brin de polarité positive, commencent la réplication de l'ARN viral par la synthèse d'un intermédiaire négatif. Le domaine *oriR* en 3'UTR a été proposé comme étant l'origine de réplication menant à la synthèse de l'intermédiaire ARN(-) [252, 269]. Le 3'UTR des *Flaviviridae* est aussi une région structurée qui est essentielle pour la réplication du génome viral [270-272]. En plus des origines de réplication, des structures ARN localisées à la fois dans les régions traduites et non traduites régulent la réplication de l'ARN viral. Par exemple chez les *Picornaviridae* [273], le génome du rhinovirus-14 humain possède une structure ARN impliquée dans la réplication du génome au niveau de la séquence codant pour la capsid [274]. Parmi tous les *Picornaviridae*, le génome du virus de la fièvre aphteuse est le seul à posséder un élément structural CRE en dehors de la région codante. Cette structure secondaire est présente en amont de son IRES [268].

Comme pour l'élément IRES les exemples de virus cités ci-dessus ne représentent qu'une infime partie des virus possédant des éléments ARN dans leur génome jouant un rôle dans la réplication virale. En effet, par exemple les *Coronaviridae* [275] ou certains virus de plante, comme le virus de la mosaïque nécrotique de trèfle rouge [276], ont dans leurs génomes des structures ARN régulant la réplication virale. Un autre exemple, le *Retroviridae* VIH-1 possède un élément structural appelé TAR pour «*Trans-Acting Response element*» qui est présent en 5' de l'ARN viral naissant [277]. La liaison de la protéine virale Tat sur cette structure tige-boucle permet d'activer la transcription et ainsi la réplication virale [278, 279].

D'autres éléments structuraux régulateurs

Certains virus possèdent des structures ARN constituant des signaux d'encapsidation du génome, lors de la formation des nouvelles particules virales. Des structures ARN présentes dans le génome de *Retroviridae* comme le VIH-1 permettent la dimérisation du génome [280]. Cette dimérisation se fait par une interaction ARN-ARN appelé « kissing » entre les structures tige-boucles de la région Ψ /DLS du génome. L'interaction est suivie par la formation d'un dimère qui permet l'encapsidation des génomes viraux [254, 281].

Il existe des structures ARN servant de signal pour l'export du génome viral hors du noyau. En effet le VIH-1, comme tous les rétrovirus, doit exporter du noyau cellulaire son ARN génomique. Un domaine très structuré en tige-boucles, appelé RRE pour « cis-acting Rev Response Element », présent dans la séquence codante du gène Env, permet l'export nucléaire de l'ARNm viral non épissé ou partiellement épissé. Ce transport est possible grâce à la liaison entre la protéine virale Rev et cette structure ARN [282-284].

Chez les virus à ARN simple brin de polarité négative tels que le Nipah virus [285], le virus respiratoire syncytial humain [286] (*Paramyxoviridae*) et le virus Ebola [287] (*Filoviridae*), des éléments en cis sur le génome et sur l'antigénome sont requis pour différentes étapes du cycle viral. Cependant la présence et l'importance de structures ARN dans ces régions sont soit peu ou pas étudiées, soit la séquence a plus d'importance que la structure [287]. Chez le virus de la grippe A (*Orthomyxoviridae*), virus à ARN de polarité négative et segmenté, des séquences en cis sont nécessaires à l'encapsidation mais il ne semble pas que des structures ARN y soient présentes [288]. Chez les rotavirus (*Reoviridae*), virus à ARN double brin segmentés, des analyses bioinformatiques des séquences positives ont mis en évidence la

présence de structures ARN dans certains segments qui pourraient jouer un rôle dans la réplication et la traduction [289].

2.1. Le génome du virus de l'hépatite C

2.1.1. Structure-fonction du 5'UTR du VHC

La séquence 5' UTR du VHC est une région hautement conservée de 341 nucléotides et structurée en quatre domaines. Contrairement au domaine I possédant une structure tige-boucle [290], les structures des domaines II [291, 292], III [293-295] et IV du 5'UTR, sont importantes pour la traduction du VHC [290]. En effet, ces domaines du 5'UTR constituent un élément IRES qui permet l'initiation de la traduction virale indépendamment d'une coiffe [110, 290, 296-300].

L'IRES du VHC adopte un repliement unique à des concentrations physiologiques de sel [299]. L'existence et l'importance des structures secondaires présentes ont été montrées *in vitro* par différentes techniques [291-295, 297, 299, 301-306]. L'IRES du VHC débute au niveau du domaine II du 5'UTR. Celui-ci est formé d'une structure tige-boucle avec une boucle interne et une boucle apicale [292, 297, 306]. Le domaine III est un domaine complexe formé de plusieurs tige-boucles formant les sous domaines IIIa, b, c, d, e et f [297]. La partie basale de ce domaine est constituée d'une petite structure en tige-boucle (IIIe) et d'un pseudo-nœud (III f) qui joint le domaine II et III et s'apparie directement avec la séquence en amont du domaine IV (figure 1.15). La partie du milieu est constituée d'une tige-boucle (III d) et trois tige-boucles IIIa, b et c forment la région apicale [297]. Le domaine IV est une petite structure

en tige-boucle qui contient le codon AUG initiateur [307]. Il existe différents codons AUG dans l'IRES du VHC, cependant la structure IRES permet l'entrée directe du ribosome au niveau du codon initiateur authentique [111, 308]. En effet, la région formée des trois domaines IIIe, IIIf et IV formerait une structure appelée « t-RNA like », facilement reconnue par le ribosome. Cette structure est hautement conservée parmi tous les sous-types du VHC et parmi les pestivirus [301, 302, 309] (figure 1.15).

L'activité IRES du 5'UTR du VHC est liée à la conservation de sa structure secondaire [310]. Cette structure est dynamique et permet la liaison des différents facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction du VHC [303]. Les domaines II et III de l'IRES sont les plus importants fonctionnellement [298]. L'initiation de la traduction débute par le recrutement direct de la sous-unité ribosomale 40S sans l'aide de protéines cellulaires. Les domaines IIIc, d, e et f permettent la liaison de cette sous-unité ribosomale [294, 300, 310]. Dans cette étape, le pseudo-nœud est crucial car cette structure permet le positionnement du codon d'initiation AUG au niveau du site P du ribosome [311, 312]. Les domaines apicaux IIIa et b interagissent ensuite avec la protéine cellulaire eIF3 [293, 300, 302, 313]. Ceci entraîne le recrutement du complexe ternaire eIF2-GTP-ARN^tiMet qui est nécessaire et suffisant pour l'assemblage du complexe 48S [310, 313, 314]. Il est aussi possible que la sous-unité 40S soit déjà associée avec eIF3 et le complexe ternaire eIF2-GTP-ARN^tiMet avant d'interagir avec l'IRES. Toutefois la liaison de 40S avec l'IRES n'exige pas cette association [315]. L'hydrolyse du GTP, médiée par eIF5 et facilitée par le domaine II [316] de l'IRES, entraîne la relâche d'eIF2-GDP. Le facteur eIF3 est ensuite relâché et l'initiation se termine par le recrutement de la sous-unité ribosomale 60S afin de générer le complexe ribosomal 80S, compétent pour l'élongation [176] (figure 1.16).

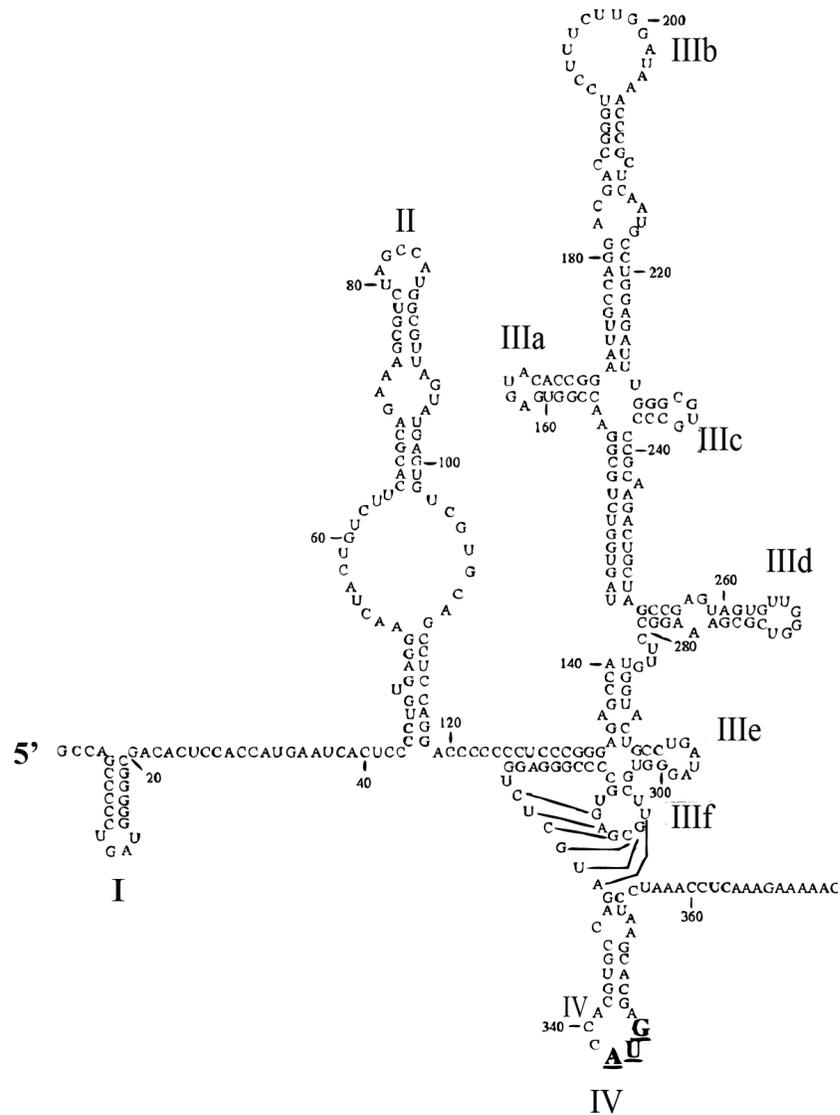


Figure 1.15 : Structure du 5'UTR du génome du VHC (adaptée de Honda et al. 1999 [317]).

Structure secondaire du 5'UTR du VHC composée de quatre domaines hautement structurés. L'initiation de la traduction du virus a lieu au niveau de l'IRES compris entre les domaines II et IV.

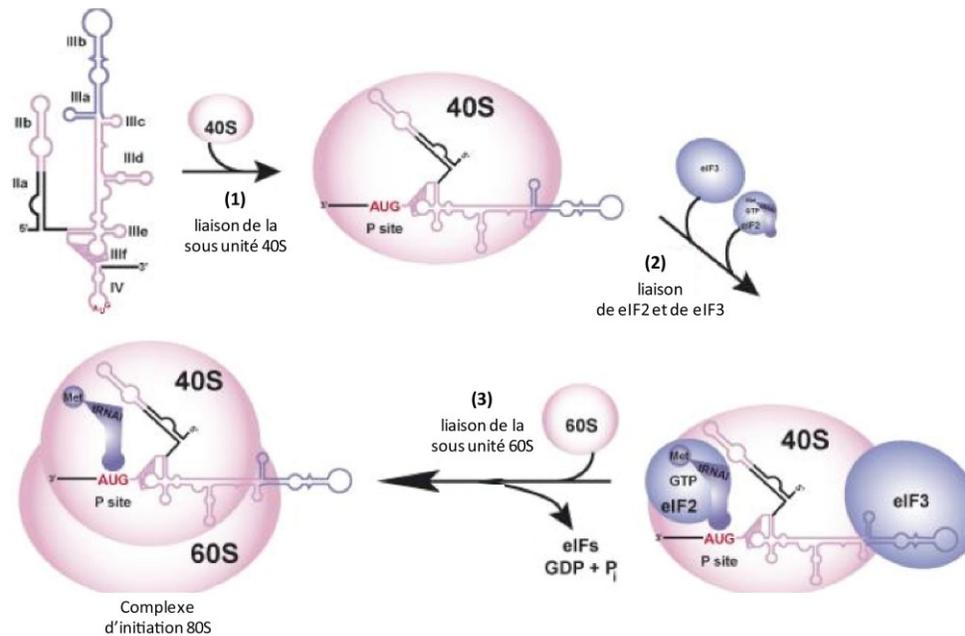


Figure 1.16 : Initiation de la traduction du VHC (adaptée de Lukavsky 2009 [298])

Ce modèle d'initiation de la traduction du VHC montre que la sous-unité ribosomale 40S se lie directement à l'IRES. Le facteur eIF3 et le complexe ternaire (ARNⁱMet-eIF2-GTP) sont ensuite recrutés formant le complexe 48S. L'initiation de la traduction se termine par la liaison de la sous-unité ribosomale 60S formant ainsi le complexe 80S.

L'activité IRES chez le VHC permettrait au virus d'«échapper» à la réponse antivirale induite par l'IFN. En effet, l'activation de la kinase PKR entraîne la phosphorylation d'eIF2 α ce qui limite la formation du complexe ternaire eIF2.GTP.ARNⁱMet et donc diminue la quantité du complexe 43S. La traduction de l'ARN viral devrait donc être bloquée. Cependant il a été montré que la formation des complexes 40S et 48S sur l'IRES du VHC n'est pas affectée par l'absence d'eIF2 dans le complexe ternaire [318, 319].

2.1.2. Structure-fonction du 3'UTR(+) et (-) du VHC

Comme le 5'UTR, l'étude de la structure secondaire du 3'UTR de l'ARN(+) et de l'ARN(-) du VHC s'est faite *in vitro* par différentes techniques. Les principales approches qui ont été utilisées sont l'analyse enzymatique [191, 320, 321], chimique [191, 320] et les prédictions de structure par bioinformatique [191, 322, 323].

Structure du 3'UTR(+)

La séquence 3'UTR du génome du VHC (ARN(+)) a une longueur qui varie de 200 à 235 nucléotides. Elle est constituée d'une région variable, suivie d'une région polypyrimidine (polyU/UC) et d'une région hautement conservée de 98 nucléotides : la région 3'X [322-324]. La séquence qui suit immédiatement le codon terminateur est la région variable. Cette dernière est une séquence variable en longueur et en nucléotides selon tous les génotypes du VHC. Des analyses informatiques ont prédit des structures tige-boucles dans cette région [323, 325]. La séquence poly(U/UC) est constituée d'une séquence répétée d'uridines et d'une région répétée de cytidines et uridines (polyU/C(U)_n) qui varient en longueur et en séquence selon les génotypes du VHC [322]. La région X est hautement conservée parmi tous les génotypes du virus, et l'analyse *in vitro* de la structure secondaire a montré que la séquence se replie en 3 tige-boucles : SL1, SL2 et SL3 [320, 321]. Cependant la présence de la structure SL2 semble controversée [326] (figure 1.17).

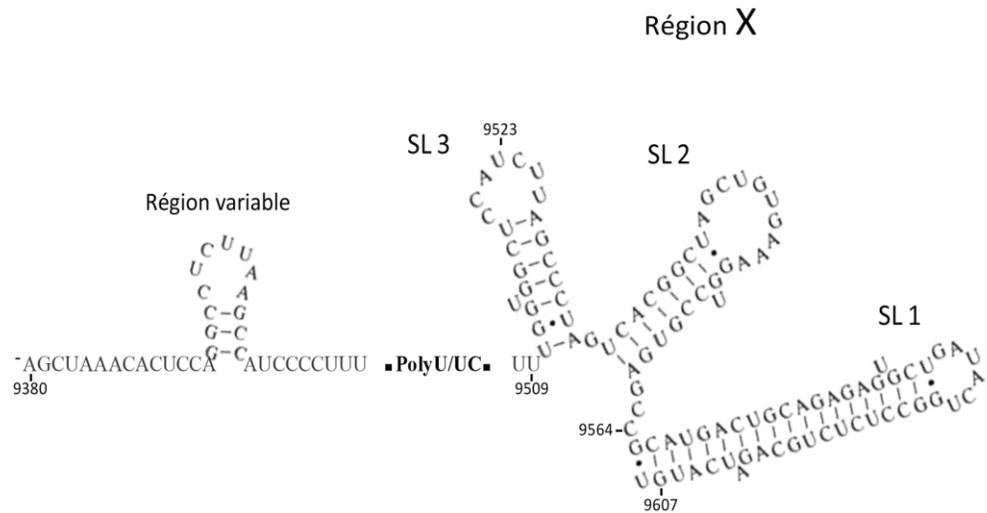


Figure 1.17 : Structure du 3'UTR du génome du VHC (adaptée de Ito et Lai 1997 [321]).

Modèle de structure secondaire du 3'UTR(+) de l'ARN du VHC. Le 3'UTR est constitué d'une région variable, suivie d'une séquence riche en uridines et cytidines, et de la région 3'X. Les trois tige-boucles SL1, SL2 et SL3 forment la région 3'X.

Structure du 3'UTR(-)

Très peu d'informations sont connues sur le 3'UTR de l'ARN(-). Cependant quelques études ont été réalisées et deux modèles ont été proposés. Le 3'UTR(-) est la séquence antisens de la région 5'UTR(+) et des 74 premiers nucléotides de la séquence codante de la polyprotéine. Smith et al ont démontré que le 3'UTR(-) serait constitué de 7 tige-boucles [327]. Un autre modèle de structure secondaire a été proposé par Schuster *et al.* [191] soutenu par Dutkiewicz *et al.* [328]. Il a été montré que cette région est formée en 5 tige-boucles très stables

formant le domaine I [74]. Ce domaine est lié à une structure moins stable nommée domaine II. Bien que le 3'UTR(-) soit la séquence antisens du 5'UTR(+), ces deux domaines adoptent des conformations qui ne sont pas des images miroirs l'une de l'autre [191]. Les extrémités 3' des brins (+) et (-) sont différentes en structure. Cependant, la tige-boucle SL-CI du brin (-) est comparable à la structure SL1 du brin (+). De plus, les boucles SL-E1 du brin (-) et SL2 du brin (+) présentent 60% d'homologie nucléotidique (figure 1.18) [191]. Ainsi, des motifs structuraux communs aux 3'UTR(+) et (-), joueraient des rôles clés dans le processus de réplication [191, 329].

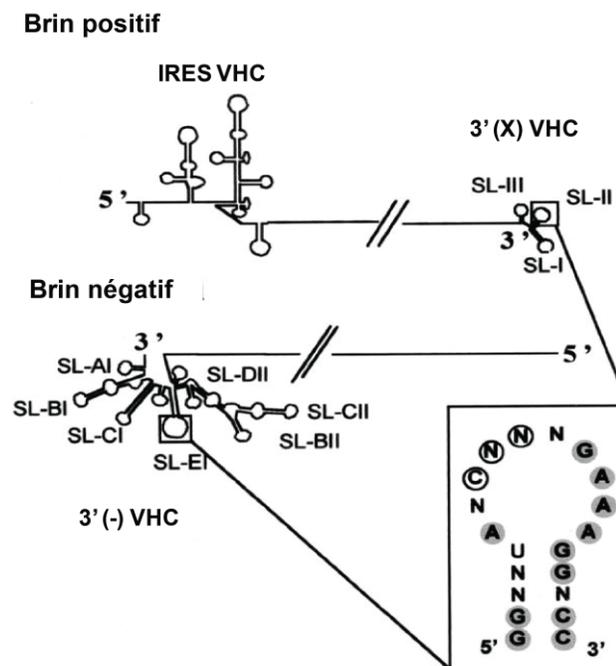


Figure 1.18 : Structure du 3'UTR des brins (+) et (-) du VHC (adaptée de Schuster et al. 2002).

Prédiction des structures secondaires présentes dans le 3'UTR(-). L'agrandissement présente en ombré les nucléotides conservés entre SL2 du brin (+) et SL-EI du brin (-) [191].

Fonction des 3'UTR(+) et (-)

Le 3'UTR(+) a un rôle essentiel dans la réplication de l'ARN du VHC. Il sert de site d'initiation à la synthèse de l'ARN(-). La réplication commence par la liaison d'un complexe protéique au niveau du 3'UTR du brin (+) afin de reconnaître la structure et d'initier la synthèse. Il comprend des protéines non structurales du VHC comme la protéase hélicase/NTPase NS3, NS3/4A et NS5A [140, 144, 153, 330-334] mais aussi certaines protéines cellulaires. Ce complexe protéique est appelé CR dont la protéine principale est l'ARN polymérase ARN dépendante, NS5B. Deux modèles de conformation de NS5B sont proposés pour l'initiation de la synthèse. L'un propose que la polymérase fonctionne comme un monomère au moins au niveau de l'initiation [155, 335] et l'autre que NS5B soit sous forme oligomérique pour être active [336-339]. Quelque soit le modèle, la polymérase virale NS5B interagit avec la région 3'X au niveau de la tige-boucle SL2 et de la séquence liant SL1 et SL2 [109, 340, 341]. Une analyse mutationnelle a permis de démontrer que la structure tige-boucle SL1 est essentielle pour la réplication de l'ARN du VHC [271]. Les mécanismes exacts de l'initiation de la réplication ne sont que partiellement connus et parfois controversés [341, 342]. Toutefois, l'initiation de la réplication semble avoir lieu au niveau de la tige-boucle SL1 de la région 3'X [340, 342]. Hong et al. proposent que la polymérase NS5B positionne les séquences de l'extrémité 3' du génome au niveau de son site actif de manière à initier la synthèse de l'ARN(-) [343]. La synthèse *de novo* commencerait par la formation d'un produit d'initiation formé de dinucléotides catalysés par NS5B [341, 344]. Zhong et al ont proposé que NS5B puisse utiliser des petits transcripts d'ARN abortif comme amorce à la synthèse *de novo*. Ces ARN seraient générés soit par la transcription cellulaire soit par NS5B [345].

Cette synthèse *de novo* va permettre de produire de l'ARN(-). Le brin (-) synthétisé va ensuite servir de matrice pour produire de nouveaux brins ARN(+), également réalisé par la

protéine NS5B. Le 3'UTR(-) joue un rôle analogue au 3'UTR(+) [341, 346]. La synthèse du brin (+) débute par la reconnaissance de l'extrémité 3' du brin (-) par NS5B et probablement d'autres facteurs cellulaires et viraux sous forme d'un complexe contenant au moins l'hélicase NS3 [331]. NS5B reconnaît donc à la fois l'extrémité 3' du brin (+) et celle du brin (-), suggérant une conservation de motifs entre ces deux structures nécessaires à la spécificité de la polymérase (figure 1.18). Plusieurs domaines de la région 3'(-) sont impliqués dans la réplication [346-348]. SL-A1 et SL-B1 sont deux structures importantes du 3'UTR(-) et pourraient représenter le site d'initiation de la synthèse du brin (+), alors qu'elles interviennent peu dans la liaison avec NS5B [349, 350]. Ces deux structures correspondent aux domaines I et II de l'IRES nécessaires et suffisants pour la réplication de l'ARN viral [341, 351].

Les différents domaines et structures du 3'UTR(+) jouent un rôle important dans la réplication de l'ARN viral mais aussi dans d'autres étapes du cycle viral. Il ne semble pas que la région hypervariable ait un grand rôle dans la réplication [352] mais la délétion de cette région inhibe la réplication [353]. Au contraire, à la fois le domaine poly(U/UC) et la région X sont des éléments critiques pour la réplication du VHC *in vivo* [140, 340, 352, 353]. La longueur de la région poly(U/UC) pourrait influencer la réplication virale et l'infectivité chez le chimpanzé [352-356]. En plus d'être le site d'initiation de la réplication de l'ARN viral, il a été montré que la délétion de la région X abolissait l'infectivité et l'infectiosité du VHC chez le chimpanzé [140, 352]. De plus, la séquence SL2 de la région 3'X permettrait au génome du VHC de se dimériser grâce à une interaction ARN-ARN de type « kissing » [357] impliquant la protéine Core [358-360]. Le rôle de cette dimérisation dans le cycle viral n'est pas connu mais elle pourrait expliquer l'apparition de certains virus recombinants.

L'interaction de nombreuses protéines cellulaires avec le 3'UTR a été largement documentée [197, 361, 362]. Ces protéines ont un rôle dans la réplication du VHC [363]. En effet, la suppression d'expression de certaines compromet la réplication de l'ARN viral [364]. Les protéines cellulaires comme la polypyrimidine tract-binding protein (PTB) qui se lie au 3'UTR(+) et (-) [191, 321], la protéine La et des protéines ribosomales [365-367] semblent intervenir pour stabiliser le 3'UTR.

2.1.3. Structures ARN dans la région codante du VHC

La séquence codante de la protéine Core

La séquence codante de la protéine Core contient aussi des structures hautement organisées et conservées qui auraient une action régulatrice sur la traduction du VHC [368-371]. Des études bioinformatiques ont prédit quatre structures tige-boucles dans cette région codante : SL 47(SL-V), SL 87 (SL-VI), SL 248 et SL 443 [370, 372]. Différents articles ont mis en évidence que la séquence codante de la protéine Core et plus particulièrement les structures ARN présentes sont impliquées dans la modulation de la traduction du VHC [317]. En effet, le maintien des éléments structurels SL-V et SL-VI est requis pour la traduction du VHC [369] (figure 1.19). Une étude suggère que ces deux tige-boucles activeraient la traduction du VHC, soit en interagissant avec des facteurs protéiques, soit en réalisant une interaction ARN-ARN de longue distance avec le 5'UTR du génome du virus [369]. Cependant, d'autres équipes ont montré qu'une interaction ARN-ARN distale, entre 5'UTR et la région codante de Core, a un effet répressif. La tige-boucle SL-VI pourrait interagir avec le domaine I du 5'UTR, ce qui inhiberait la traduction [317, 373]. Toutefois, en 2007 une autre

étude réalisée avec des mutations dans la séquence codante de Core a permis de mettre en évidence que la structure de la tige-boucle SL-VI est essentielle dans le cycle virale du VHC [129]. Il a été également suggéré que ces structures moduleraient la réplication de l'ARN du VHC [369].

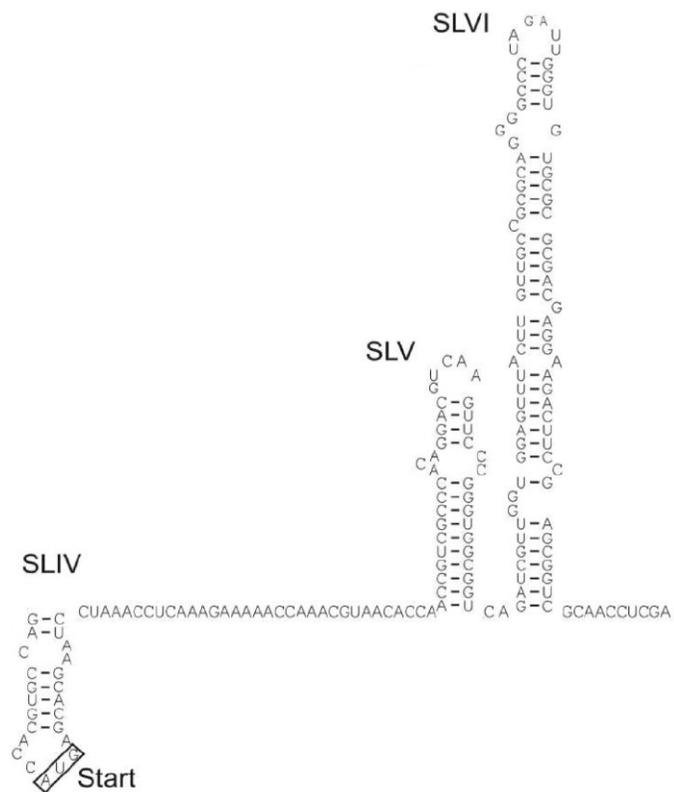


Figure 1.19 : Structures ARN de la région codante de Core (adaptée de McMullan et al. 2007).

Prédiction de la structure secondaire des tige-boucles SL-V et SL-VI présentes dans la région codante de la protéine Core [129].

La séquence codante de la protéine NS5B

Des structures ARN conservées ont été prédites dans la séquence codante de la polymérase virale NS5B. Il a été suggéré que la séquence codante de cette protéine forme des structures particulières en tige-boucles [368, 370, 371, 374] (figure 1.20 A). L'une d'elles est une structure composée de trois tige-boucles en croix: 5BSL3.1, 5BSL3.2 et 5BSL3.3 [109, 375]. Il a été démontré que l'interaction par «kissing » de la tige-boucle 5BSL3.2 avec la tige boucle SL2 de la région 3'X du 3'UTR est nécessaire à la réplication de l'ARN viral [356, 375-378] (figure 1.20 B). La tige-boucle 5BSL3.2 interagit aussi avec une séquence non structurée située 200 nucléotides en amont [379]. Cette association est aussi importante pour la réplication de l'ARN viral. Cependant, la manière dont cette interaction se fait est inconnue. Elle pourrait avoir lieu simultanément avec l'appariement 5BSL3.2/SL2 et stabiliserait ce dernier [379, 380]. La structure formée, par ces différentes interactions, serait différente suivant le génotype VHC (Con-1 : génotype 1b et JFH-1 : génotype 2a) [380]. En outre, il a été montré que 5BSL3.2 joue un rôle dans la traduction du VHC en réalisant une interaction distale ARN-ARN avec l'IRES [381, 382].

2. Les superstructures du génome du VHC

Le VHC, comme tous les virus à ARN de polarité positive, a son génome qui sert de support à la fois pour la traduction et la réplication de l'ARN viral. Des structures ARN régulatrices de l'extrémité 5' du génome du VHC affectent principalement la traduction virale et celles dans le 3', la réplication. Cependant, certaines structures ARN ont un double rôle en régulant ces deux processus.

Dans la région 3' du génome du VHC, les données les plus récentes indiquent que la présence des structures du 3'UTR, importantes pour la réplication de l'ARN viral, stimulent la traduction virale [186, 383-385]. De plus, la structure 5BSL3.2 présente dans la séquence codante de NS5B est impliquée à la fois dans la réplication [375, 377] et dans la traduction du VHC [381, 386, 387]. Au niveau de l'extrémité 5', le 5'UTR est important pour la traduction virale dû à la présence de l'élément IRES [110, 298]. Cependant deux domaines du 5'UTR (domaines I et II) sont aussi nécessaires à la réplication du génome [351, 388, 389]. Il a aussi été montré que les structures présentes dans la séquence codante de la protéine Core régulent la traduction et la réplication de l'ARN du VHC [129, 369, 373].

Ainsi, dans le génome du VHC des structures ARN peuvent être multifonctionnelles en étant impliquées dans plusieurs processus comme la traduction et la réplication du génome viral [351, 385, 390]. Ces structures ARN du génome, localisées dans des régions distales les unes des autres, sont intimement liées. Cet aspect de la régulation en cis suggère que les extrémités du génome pourraient interagir soit par des interactions ARN-ARN soit à l'aide de protéines.

Les superstructures et la circularisation du génome

Des analyses bioinformatiques, ont permis de mettre en évidence l'existence d'interactions distales ARN-ARN dans le génome des virus de *Picornaviridae*, de *Caliciviridae* et de *Flaviviridae* incluant le VHC [372, 391-393]. Ces interactions entraînent la formation de superstructures ARN hautement organisées appelées GORS (Genome-scale Ordered RNA Structures). Les génomes viraux pourraient ainsi prendre des conformations particulières comme la circularisation.

En biologie, la circularisation de l'ARN joue un rôle très important. Dans les cellules eucaryotes, l'ARNm adopte cette conformation pour stimuler la synthèse des protéines [384, 394-396]. En effet, la queue poly (A) de l'ARNm stimule le recrutement de la sous-unité 40S grâce à l'interaction du complexe eIEF4F et de la protéine Pab1p. Cela implique que les protéines cellulaires agissent comme un pont moléculaire entre les deux extrémités de l'ARNm entraînant sa circularisation [395].

La circularisation du génome est une caractéristique commune à de nombreux virus d'animaux et de plantes [397-400]. Cette conformation de l'ARN viral peut présenter certains avantages dans la traduction, la réplication ou la stabilité du génome viral [381, 401-404]. Le mécanisme permettant la circularisation du génome peut être différent suivant le virus. Chez certains virus comme le poliovirus (*Picornaviridae*), la circularisation se produit avec des facteurs protéiques. En effet le génome de ce virus semble se circulariser grâce à la protéine Pabp1 qui permet d'établir une interaction de type protéine-protéine et protéine-ARN entre les extrémités de l'ARN viral [399]. Le virus de la dengue (*Flaviviridae*) [398], quant à lui, a son génome qui se circularise grâce à des interactions ARN-ARN distales. Des séquences inverses complémentaires en 5' et en 3' du génome de ce *flavivirus* permettent la formation d'interactions ARN-ARN distales (ou LRI pour « Long Range RNA-RNA Interaction »). Il a

été montré que ces interactions étaient nécessaires à la réplication de l'ARN viral [401-407]. La circularisation de l'ARN génomique est un motif qui a été retrouvé chez d'autres virus. En effet, une interaction ARN-ARN distale entre les extrémités 5' et 3' du génome ARN du VIH-1 a été identifiée. Cette circularisation serait importante durant la transcription inverse [408, 409].

Chez le VHC, il a d'abord été supposé que le génome se circularisait à l'aide de protéines cellulaires [179, 271, 353, 410, 411]. En effet, la protéine PTB interagit à la fois avec le 5' et le 3'UTR ce qui a permis d'émettre l'hypothèse que cette protéine serait impliquée dans une interaction entre le 5' et le 3'UTR menant à la circularisation du génome [321, 365, 385, 410, 412-415]. En 2011, Wang et al. ont démontré que la protéine cellulaire PCBP2 était impliquée dans la circularisation du génome du VHC [416]. Cependant récemment, une équipe a fourni des preuves physiques et fonctionnelles montrant qu'une interaction ARN-ARN distale, entre l'IRES et la structure 5BSL3.2 de la séquence codant pour NS5B, influençait la traduction du VHC [381, 382, 387]. De plus, des analyses bio-informatiques prédisent d'autres interactions de ce type dans le génome du VHC [372]. Ainsi d'après les dernières études publiées il semblerait que le génome du VHC se circularise par des interactions ARN-ARN distales. La conformation du génome circulaire pourrait jouer un rôle dans la stabilité de l'ARN viral, dans la modulation de la traduction, de la réplication de l'ARN viral et/ou dans le mécanisme de transition entre la synthèse protéique et la réplication de l'ARN [391, 392].

V. PROBLÉMATIQUE

Différents facteurs viraux et cellulaires peuvent influencer le cycle de réplication du VHC. L'un de ces facteurs est l'arrangement structural du génome du VHC.

L'initiation de la réplication du VHC se fait au niveau des structures de la région 3' du génome. Les études réalisées sur ce domaine ont montré que le 3'UTR est hautement structuré [320, 321, 323]. Cependant, ces dernières ont souvent été faites dans des conditions ne reflétant pas la réalité. Ainsi, une meilleure visualisation des structures du 3'UTR(+) dans des conditions biologiques, permettrait de mieux comprendre le mécanisme de réplication.

Dans les génomes viraux, les interactions ARN-ARN distales ont un rôle important dans le cycle viral [402, 405]. Dans le génome du VHC les extrémités 5' et 3' possèdent des éléments structurels qui régulent à la fois la traduction et la réplication virale [351, 385]. Ce phénomène suggère que les extrémités du génome pourraient interagir afin de moduler ces deux processus. Cependant, très peu de données ont été obtenues sur cette régulation.

La défense antivirale dont la régulation est dépendante de l'interaction virus-hôte, est un autre facteur important influençant le cycle de réplication du VHC.

La fibrose hépatique est une complication de l'infection par le VHC. Il a été montré que l'utilisation d'une molécule appelée thalidomide réduit la fibrose en inhibant l'expression de cytokines pro-inflammatoires [417]. Cependant cette molécule est aussi connue pour interagir avec certains acteurs de la défense antivirale [418]. Ainsi l'effet de la thalidomide sur la réplication du VHC devrait être connu avant son utilisation chez des patients infectés par le VHC.

VI. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Je me suis d'abord intéressée au génome du VHC.

1) Notre laboratoire a émis l'hypothèse qu'une meilleure visualisation *in situ* de la structure secondaire du 3'UTR dans un contexte de génome entier, permettrait d'améliorer notre compréhension sur la réplication du VHC. Ainsi j'ai entrepris de mettre en évidence les structures ARN simple brin et double brin du 3'UTR du génome du VHC dans des conditions biologiques.

2) En nous inspirant d'études récentes faites sur des virus à génome d'ARN(+), nous avons émis l'hypothèse qu'une interaction entre des régions distales du génome du VHC serait impliquée dans la modulation du cycle viral. J'ai ainsi eu l'objectif de prouver l'existence d'une interaction ARN-ARN entre les extrémités 5' et 3' du génome viral et de démontrer que cette structure tertiaire affecte la réplication de l'ARN du VHC.

Parallèlement j'ai travaillé sur un aspect de l'interaction virus-hôte.

3) Nous savions que la thalidomide, molécule immuno-modulatrice, permet de réduire la fibrose hépatique. Or, l'influence de cette molécule sur le cycle viral du VHC était inconnue. Ainsi j'ai eu pour but d'étudier l'effet de la thalidomide sur la réplication du VHC *in vitro*.

Chapitre 2 : Modèle de VHC de génotype 1b

MODÈLE DE VHC RÉPLICATIF EN CULTURE CELLULAIRE DE GÉNOTYPE 1b.

Le VHC cause une hépatite chronique avec manifestations sérieuses, telles que la cirrhose et le cancer du foie. On estime que ce virus affecte 3% de la population mondiale, dont 250,000 porteurs au Canada [5].

Le VHC est un virus enveloppé à ARN simple brin qui possède sept génotypes et plus de 100 sous-types [95]. Parmi tous les génotypes et sous types, le génotype 1b est à la fois le plus répandu dans le monde et le plus résistant au traitement standard composé d'interféron alfa pégylé et de ribavirine [50, 95]. Récemment, l'efficacité du traitement a été améliorée en ajoutant la première génération d'inhibiteurs de protéase virale [51]. Cependant le développement de nouveaux antiviraux ayant différents modes d'action, permettrait d'améliorer le traitement et d'éviter l'émergence de virus résistants. Ainsi, une meilleure compréhension du cycle réplicatif du VHC est nécessaire.

Pendant longtemps l'absence de système réplicatif était un obstacle majeur pour étudier le cycle viral complet du VHC. En 2005, un système de culture cellulaire *in vitro* pour le VHC de génotype 2a (JFH1 [104]) a été développé menant à de nombreuses études sur le cycle viral. Un système réplicon subgénomique pour le génotype 1b, appelé Con1, a été développé en 1999 [214]. Ce réplicon est capable de se répliquer en culture cellulaire, cependant il ne permet pas

d'obtenir des virus infectieux [221]. Ainsi l'obtention d'un système pour le VHC de génotype 1b capable de se répliquer et de produire des virus infectieux en culture cellulaire est primordiale. Ces dernières années deux équipes ont montré que des efforts étaient faits dans ce sens [227, 228].

Durant la première année de mon PhD, j'ai développé un système répliatif du VHC de génotype 1b, appelé ER-1b. Les données qui vont suivre montrent que ce système est capable de se répliquer et de produire des virus infectieux en culture cellulaire. C'est un outil important pour les différentes études sur le cycle de vie du VHC de génotype 1b. Cet outil a été utilisé dans les deux premiers articles de ma thèse.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Culture cellulaire.

La lignée d'hépatocarcinome humain Huh-7, fournie par le Dr Tatsuo Takahashi (Health Science Research Resources Bank, Japon), a été cultivée dans du milieu « Dulbecco's modified Eagles » (DMEM) (Invitrogen) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, sous 5% de CO₂. Les hépatocytes primaires humains, obtenus de LONZA (Bâle, Suisse), ont été cultivés sur une couche de collagène de type 1 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) dans des flacons ou sur lamelles avec un milieu de culture pour hépatocytes (HCM, Lonza), ou du milieu « DMEM - high glucose » additionné de L-glutamine, L-méthionine, L-leucine, L-ornithine, de dexaméthasone et d'insuline (Sigma-Aldrich) [419]. Les hépatocytes primaires ont été cultivés durant 10 passages maximum.

Construction du plasmide d'expression pER-1b.

Les plasmides d'expressions pER-1b et pJFH1 ont été utilisés comme modèles pour générer l'ARN génomique du VHC respectivement de génotype 1b et 2a. Le pJFH1 [104] a été fourni par le Dr Takaji Wakita (Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japon). Le pER-1b a été obtenu à partir du plasmide contenant l'ADNc du VHC de génotype 1b : pGEM-7Zf-HCV [420]. La séquence ciblée par miR-122 [113] dans la région 5' non traduite (5'UTR) et la région 3' non traduite (3'UTR) du VHC de génotype 1b ont été ajoutées à ce vecteur. Le 3'UTR a été obtenu par RT-PCR à partir d'ARN VHC de génotype 1b (fourni par le Dr Hugo Soudeyns, du Centre de Recherche Ste-Justine). Des modifications ont aussi été introduites dans le promoteur de l'ARN polymérase T7 présent en amont de l'ADNc du VHC : GAAGCTTGTAATACGACTCACTATAGCCAGCCCC. L'initiation de la transcription a lieu au niveau du nucléotide (nt) +1 (gras souligné). Une série d'étapes de clonage a permis d'obtenir le plasmide d'expression du génome entier du VHC-1b (pER-1b), capable de produire l'ARN génomique de génotype 1b (Figure 2.1 A). Tous les amplicons et plasmides utilisés dans la construction de pER-1b ont été vérifiés par séquençage.

Expression des ARN génomiques du VHC et transfection dans les cellules Huh-7.

Les ARN génomiques VHC (ER-1b, JFH1) ont été synthétisés en utilisant le kit « T7 MEGAscript » (Ambion-Applied Biosystems, Austin, TX) et 1 µg de plasmide pER-1b ou pJFH1 linéarisé par l'enzyme de restriction XbaI et la nucléase mung bean. Les réactions de transcription *in vitro* ont été réalisées pendant 4 à 6 h à 37°C, suivies de la dégradation de la matrice ADN par la «DNase RNase-free » (Ambion Inc). L'ARN a été purifié par phénol/chloroforme et précipité à l'éthanol. La taille des ARN génomiques a été vérifiée par migration sur gel d'agarose (0,8%) dénaturant (formaldéhyde) (figure 2.1 B).

La transfection des cellules Huh-7 par les ARN génomiques a été réalisée par électroporation. Les cellules Huh-7 ont été trypsinisées, lavées et remises en suspension à une concentration de 5×10^6 cellules /mL dans du PBS. L'ARN (5 μ g) a été mélangé avec 500 μ L de suspension cellulaire dans un tube de 1,5 mL et placé dans la glace pendant 10 min. Le mélange a ensuite été transféré dans une cuvette d'électroporation (Gene Pulser® cuvette 0.4 cm electrode gap, Bio-Rad) et pulsé à 270 V et 950 μ F en utilisant le « Gene Pulser™ » (Bio-Rad). Puis la cuvette a été mise sur la glace pendant 5 min et les cellules transfectées ont été transférées dans un puits d'une plaque à six puits, contenant 2 mL de milieu de culture. Le succès de la transfection a été évalué par immunofluorescence 2 jours post-électroporation.

Production des virus VHC et infections des cellules cibles.

Les virus servant à inoculer les cellules Huh-7 naïves ou les hépatocytes primaires ont été récoltés 2 jours après la transfection. Le milieu de culture des cellules Huh-7 transfectées par l'ARN du VHC (ER-1b ou JFH1) a été récupéré et les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à basse vitesse (1000 x g) et par filtrage (filtre de 0.45- μ m). La sécrétion des virus ER-1b dans le surnageant a été évaluée pendant 15 jours. L'ARN viral a été extrait du surnageant en utilisant le kit « QIAamp Viral RNA Mini Kit » (QIAGEN Inc, Toronto, Ontario, CANADA) avant d'être quantifié par RT-qPCR. L'infection des hépatocytes et/ou des Huh-7 par le virus a été révélée par la présence de l'ARN viral dans les cellules (RT-PCR). À 24 h post-infection, les ARN cellulaires totaux ont été extraits grâce au TriReagent® (Molecular Research Center, Inc.) Une RT-PCR a ensuite été réalisée en utilisant l'amorce VHC sens 5'-GGTCGCGTAATTTGGGTAAGGTCA-3' (nt 685-710) et l'amorce antisens 5'-TGGAGCAGTCGTTCGTGACATGAT-3' (nt 943-966) (Integrated DNA Technologies,

Iowa City, IA). Le succès de l'infection a aussi été évalué par immunofluorescence 2 jours après l'inoculation.

Infectivité des particules virales ER-1b.

Les cellules cibles (Huh-7 ou HeLa) ont été mises en présence de surnageant contenant ou non des virus ER-1b. Certaines inoculations ont été effectuées avec du surnageant infectieux traité aux ultraviolets (365 nm) pendant 30 min, ou avec du surnageant de cellules Huh-7 non transfectées mais incubées avec 5 µg d'ARN génomique ER-1b. L'infection a ensuite été évaluée par immunofluorescence 2 jours après inoculation. Pour chaque condition, le nombre de cellules positives pour la protéine NS5B a été compté sur un total de 200 cellules et l'expérience a été répétée deux fois.

Neutralisation des virus ER-1b.

Les cellules Huh-7 naïves ont été infectées avec le surnageant contenant le virus ER-1b dans lequel ont été ajoutés soit l'anticorps anti-CD81 monoclonal 1.3.3.11 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) soit l'anti-TNP monoclonal (contrôle) (BD Biosciences, Mississauga, ON, USA) à des concentrations identiques de 10 µg/mL. Pour la neutralisation avec le sérum de patients, le surnageant contenant le virus a été préalablement mélangé avec du sérum inactivé. Après incubation d'une heure, le mélange a été ajouté aux cellules Huh-7 naïves. L'infection a ensuite été évaluée par immunofluorescence 2 jours après inoculation. Pour chaque condition, le nombre de cellules positives pour la protéine NS5B a été compté sur un total de 200 cellules et l'expérience a été répétée deux fois.

Immunofluorescence.

Les antigènes du VHC, Core et NS5B, ont été détectés par immunofluorescence. Les cellules Huh-7 transfectées ou infectées par le VHC ont été fixées au méthanol, et les protéines Core et NS5B ont été reconnues par l'anticorps anti-Core monoclonal 11-B3 et l'anti-NS5B monoclonal 1826 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA). Ces anticorps primaires ont été à leur tour détectés par une incubation avec un anticorps secondaire couplé à la biotine (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) et par une autre incubation avec de la streptavidine conjuguée à la DTAF (*Dichlorotriazinylamino fluorescein*) (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Quantification de l'ARN du VHC.

L'ARN viral a été quantifié par RT-qPCR en utilisant l'amorce sens 5'-CGGGAGAGCCATAGTGG-3' (nt 130-146) et l'amorce antisens 5'-AGTACCACAAGGCCTTTCG-3' (nt 272 -290) (Integrated DNA Technologies) avec le kit « QuantiTect SYBR Green RT-PCR » (Qiagen). Les amorces ont été utilisées à des concentrations finales de 400 nM. ADNc a été amplifié et quantifié en utilisant le « Mx3000P real-time PCR thermocycler » (Stratagene Inc.) durant 40 cycles. Chaque cycle est constitué par une incubation de 15 secondes à 94°C, suivie par les étapes d'hybridation (55°C) et d'élongation (72°C) pendant 30 secondes chacune. Une série de dilutions de l'ARN VHC (ER-1b) de 1 pg à 100 ng a servi de standard. La quantité d'ARN du VHC a été normalisée par la quantité d'ARN cellulaires totaux.

Microscopie électronique.

Les cellules Huh-7 inoculées avec le virus ER-1b et maintenues pendant 3 jours à 37°C ont été fixées dans du glutaraldéhyde 3% pendant 4h dans un tampon phosphate Sorensen (pH 7,3). Puis trois lavages de 20 minutes ont été réalisés dans le même tampon contenant 1% de saccharose. Les échantillons ont ensuite été traités avec 2% d'OsO₄ pendant 2h à température ambiante puis lavés dans du PBS. Ils ont ensuite été déshydratés dans différentes concentrations d'éthanol (50, 70, 80, 95 et 100%), et trois fois dans de l'acétone 100%. Avant d'être sectionnés, les tissus ont été intégrés dans de l'Epon (Mecalab Ltd, Montréal, QC). Des cryosections ultrafines ont été recueillies sur des grilles métalliques et marquées pendant 10 min avec l'uranyle acétate 5% et 10 min avec du citrate de plomb. Finalement, les micrographies électroniques des virus intracellulaires ont été enregistrées avec un microscope électronique (modèle 208S, Philips Medical Systems, Boston, MA).

RÉSULTATS

L'ARN génomique ER-1b est traduit dans les cellules transfectées.

Par des expériences de clonage, j'ai obtenu un plasmide d'expression codant pour l'ADNc du génome entier du VHC de génotype 1b, appelé ER-1b. Les ARN génomiques ER-1b et JFH1 obtenus par transcription *in vitro* ont été transfectés dans des cellules Huh-7 (figure 2.1). Le modèle de VHC JFH1 [104] a été utilisé afin de comparer les résultats obtenus avec ER-1b et ainsi avoir une référence. L'analyse par immunofluorescence des cellules transfectées a montré que les antigènes viraux Core et NS5B étaient détectés 2 jours après la transfection (figure 2.2). Ceci indique que le génome ER-1b est fonctionnel dans les cellules Huh-7 car la traduction virale y est active.

Production de virus infectieux par les cellules transfectées par l'ARN ER-1b.

Pour déterminer si les cellules transfectées par ER-1b pouvaient générer des particules virales infectieuses, le milieu de ces cellules a été récupéré puis purifié par centrifugation et filtration. Des cellules Huh-7 naïves ont ensuite été inoculées par ce surnageant. Deux jours après l'infection, une immunofluorescence a permis de révéler la présence des antigènes viraux Core et NS5B dans les cellules Huh-7 (figure 2.3 A). De plus, une RT-PCR réalisée sur l'ARN total des cellules inoculées a permis d'y détecter l'ARN viral (figure 2.3 B). Ainsi les cellules transfectées par l'ARN génomique ER-1b peuvent produire des particules infectieuses du VHC.

Afin d'évaluer si les cellules transfectées par ER-1b pouvaient produire en continu des particules virales, les niveaux d'ARN viral dans le milieu de culture ont été quantifiés par RT-qPCR à partir du deuxième jour post-transfection. À 2 jours, la quantité d'ARN détectée dans le

surnageant est de $3,7 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$ SEM copies/mL. On peut observer une baisse de la quantité d'ARN vers 3 jours post transfection mais dès 6 jours les niveaux d'ARN augmentent pour atteindre un maximum à 10 jours de $7,5 \times 10^4 \pm 8 \times 10^3$ SEM copies/mL (figure 2.3 C). Ces résultats suggèrent que la réplication du VHC ainsi que la sécrétion des particules virales sont maintenues pendant au moins 15 jours dans les cellules transfectées par ER-1b.

Afin de caractériser les virus présents dans le surnageant des cellules transfectées par ER-1b, l'infectivité et la neutralisation de ces particules virales ont été étudiées.

Infectivité des particules virales ER-1b.

Des cellules cibles ont été inoculées avec du surnageant de cellules transfectées par ER-1b. Deux jours après, une immunofluorescence contre des antigènes viraux a été réalisée. Seules les cellules Huh-7 et les hépatocytes primaires humains inoculés, étaient positifs pour les protéines Core et NS5B (figure 2.3 A et figure 2.4 A). Afin d'exclure la possibilité que des ARN génomiques obtenus *in vitro* aient été internalisés par les cellules infectées, une expérience supplémentaire a été réalisée. Les cellules ont été inoculées avec un surnageant de cellules Huh-7 non transfectées mais incubées avec 5 µg d'ARN ER-1b (Huh-7 + ARN ER-1b). L'immunofluorescence n'a révélé aucune cellule positive pour NS5B (figure 2.4 A). En outre, l'irradiation aux ultraviolets de l'inoculum réduit de 90 % le nombre de cellules infectées (figure 2.4 A). Enfin, nous n'avons pas noté d'infection de cellules HeLa (figure 2.4 A). En effet, ces dernières sont connues pour avoir une faible permissivité au VHC [104, 421].

Neutralisation de l'infection par l'anticorps anti-CD81 et le sérum de patients infectés.

Il a été montré que la protéine cellulaire CD81 est impliquée dans l'entrée du VHC [165]. Pour déterminer si les particules ER-1b suivent la voie d'entrée du VHC, et afin de confirmer la spécificité d'infection, les cellules Huh-7 ont été inoculées avec du surnageant ER-1b en présence d'anticorps spécifiques ou non de CD81. Deux jours plus tard, les cellules infectées ont été marquées par immunofluorescence. Nous avons constaté que la présence des anticorps anti-CD81 a réduit l'infection de 90 % (figure 2.4 B). Des expériences supplémentaires de neutralisation ont été réalisées en utilisant des sérums d'individus infectés par le VHC de génotype 1. Le surnageant contenant les particules virales ER-1b a été mélangé avec du sérum de patients et l'infection a été détectée par immunofluorescence. Une diminution de 70 % de l'infection a été observée avec une dilution de 1:100 du sérum de patients (figure 2.4 B).

Ainsi les virus produits par les cellules transfectées par ER-1b ont toutes les caractéristiques du VHC. Ces particules virales infectent les cellules Huh-7 ainsi que les hépatocytes primaires humains. Toutefois, elles ne peuvent pas infecter les cellules HeLa connues pour leur faible permissivité pour le VHC [104, 421] (figure 2.4 A). De plus, les anticorps anti-CD81 et ceux présents dans le sérum de patients infectés par le VHC neutralisent l'infection induite par les virus ER-1b. Ceci permet de confirmer la spécificité d'infection d'ER-1b (figure 2.4 B).

Détection des particules virales dans les cellules infectées par microscopie électronique.

Des expériences de microscopie électronique avec les cellules infectées par ER-1b ont permis de visualiser, au niveau de vacuoles lipidiques, la présence de particules enveloppées avec une capsid (figure 2.4 D). Les particules, qui ont une taille d'environ 50 nm compatible avec la taille prédite du VHC [104, 105], sont aussi retrouvées dans le milieu extracellulaire (figure 2.4 E).

FIGURES ET LÉGENDES

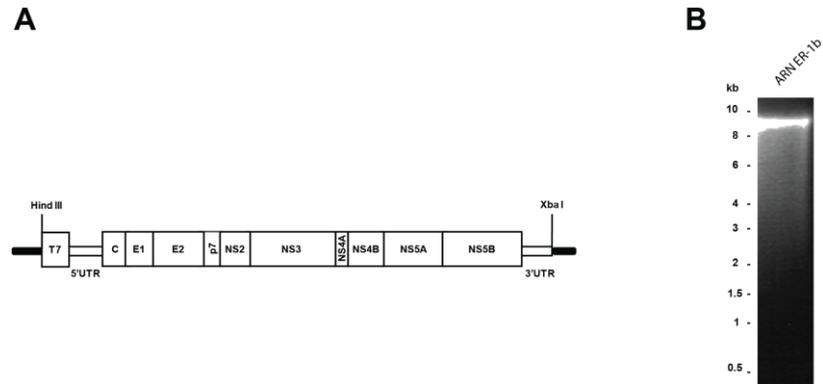


Figure 2.1 : Génome ARN du VHC de génotype 1b : ER-1b.

A) Schéma du plasmide d'expression pER-1b. Le cadre ouvert de lecture, codant pour les protéines structurales et non structurales du VHC, est flanqué par le 5' et le 3'UTR. La séquence du promoteur de la polymérase T7 est indiquée en 5' par la boîte T7. **B)** Visualisation de l'ARN génomique ER-1b obtenu *in vitro* par migration sur gel d'agarose dénaturant.

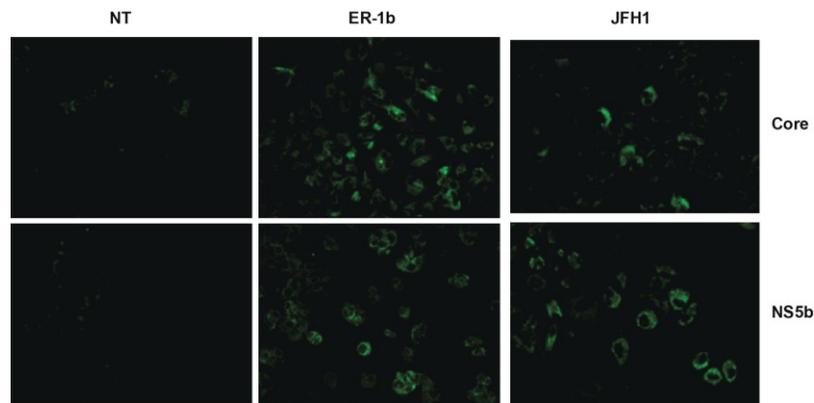


Figure 2.2 : Expression des antigènes du VHC dans les cellules transfectées par les ARN génomiques.

Les protéines Core (ligne du haut) ou NS5B (ligne du bas) ont été détectées 2 jours après la transfection des cellules Huh-7 avec les ARN génomiques de génotype 1b (ER-1b : colonne du milieu) ou 2a (JFH1 : colonne de droite). NT (Non Traitées : colonne de gauche) représente les cellules non transfectées (Grossissement microscopique x200).

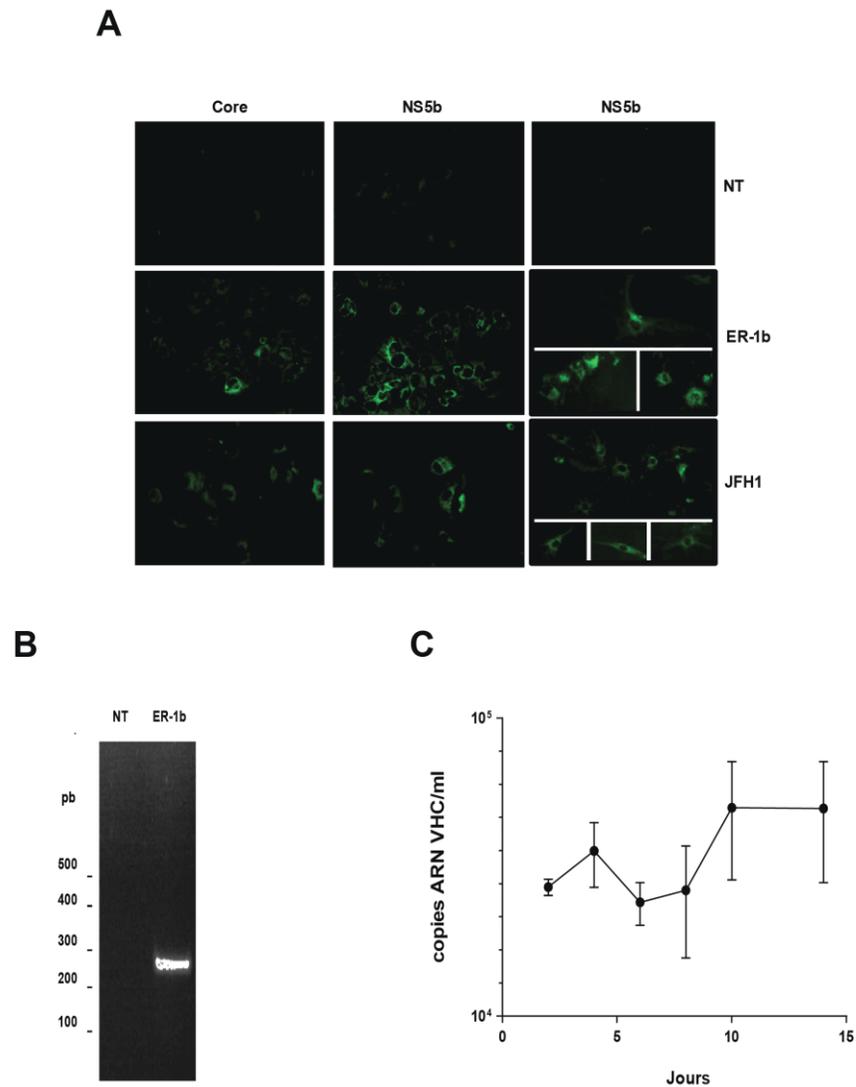


Figure 2.3 : Production de virus infectieux par les cellules transfectées par ER-1b.

A) Expression des protéines Core (colonne de gauche) ou NS5B (colonne du milieu et de droite) 2 jours après l'inoculation des cellules Huh-7 (colonne de gauche et du milieu) ou des hépatocytes primaires humains (colonne de droite) avec les virus de génotype 1b (ER-1b : ligne du milieu) ou 2a (JFH1 : ligne du bas). NT (Non Traitées : ligne du haut) représente les cellules non infectées (Grossissement microscopique x200). **B)** L'ARN viral ER-1b a été détecté par RT-PCR dans les cellules Huh-7 infectées. **C)** Suivi de la sécrétion des virus ER-1b pendant 15 jours post-transfection. Les niveaux d'ARN viral, dans le surnageant des cellules Huh-7 transfectées, ont été quantifiés par RT-qPCR. Les résultats représentent la moyenne de deux expériences \pm SEM.

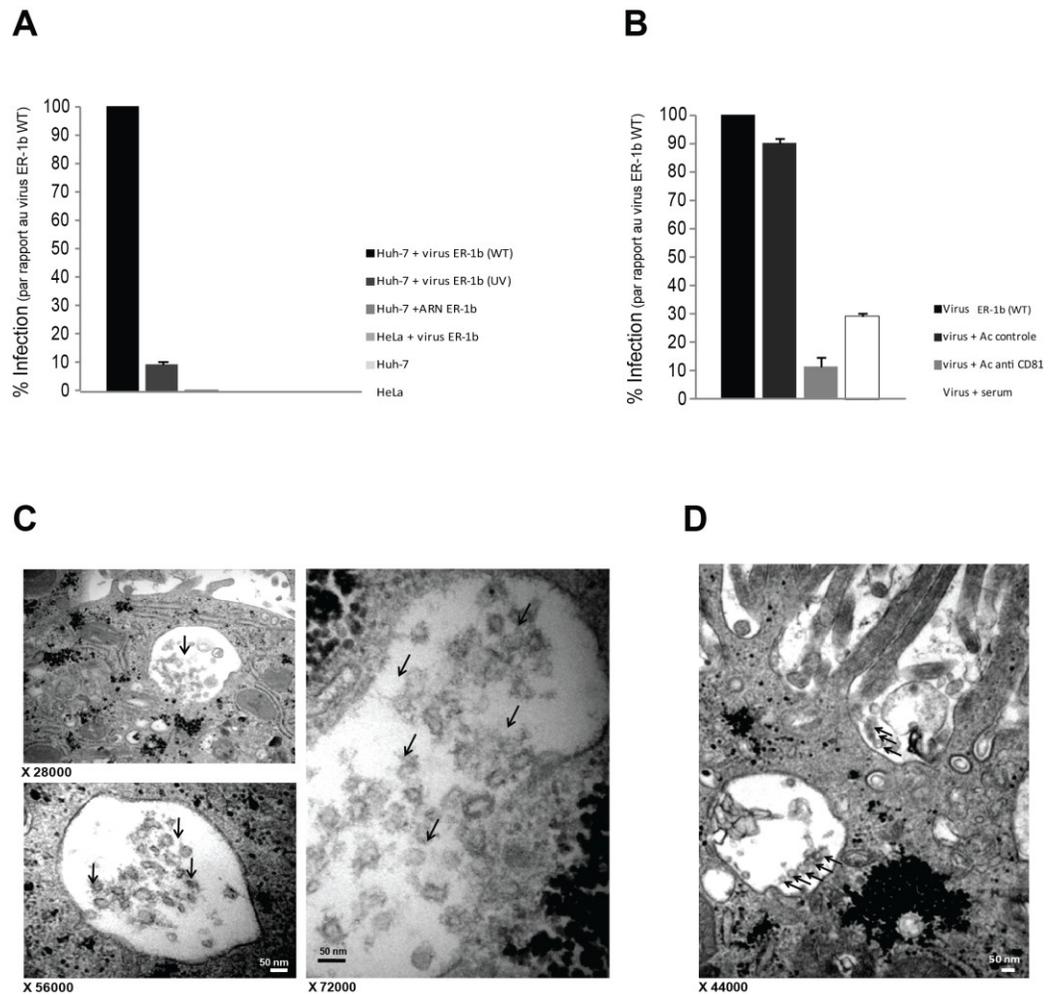


Figure 2.4 : Caractérisation du virus de génotype 1b, ER-1b.

A) Infectivité des particules virales. Les cellules cibles ont été inoculées avec du surnageant contenant des virus ER-1b seul (Huh-7 ou HeLa + virus ER-1b) ou traité aux UV (Huh-7+ virus ER-1b UV). Ces cellules ont aussi été incubées avec du surnageant de cellules non transfectées (Huh-7 ou HeLa) ou avec du surnageant de cellules Huh-7 non transfectées mais incubées avec 5 µg de l'ARN génomique ER-1b (Huh-7 + ARN ER-1b). Le graphique représente le pourcentage d'infection par rapport à l'infection obtenue avec les cellules Huh-7 et le virus ER-1b WT. **B)** Neutralisation de l'infection par le sérum de patients et par l'anticorps anti-CD81. Les cellules Huh-7 ont été inoculées avec du surnageant contenant des virus ER-1b (1/10 du volume de surnageant récupéré) additionné ou non de 10 µg/ml d'anticorps anti-CD81 (Virus + Ac anti CD81) ou d'anti-TNP (Virus + Ac contrôle). Une condition expérimentale supplémentaire a été réalisée : le surnageant a

été préalablement mélangé avec du sérum de patients infectés par le VHC (1/100) avant d'être inoculé aux cellules (virus + sérum). Le graphique représente le pourcentage d'infection par rapport à l'infection obtenue avec les cellules Huh-7 et le virus ER-1b WT. **C**) et **D**) Microscopie électronique des cellules Huh-7 infectées par l'inoculum ER-1b. Les particules virales (flèches) sont retrouvées dans des vacuoles lipidiques (**D**) (Grossissement x28000, x56000 et x72000) ou dans le milieu extracellulaire (**E**) (Grossissement x44000). La barre dans les différentes photos représente 50 nm.

CONCLUSIONS

Durant la première année de mon Ph.D, grâce à des techniques de biologie moléculaire, j'ai obtenu un plasmide codant pour l'ADNc du génome du VHC de génotype 1b. Par la suite, j'ai généré par transcription *in vitro* l'ARN génomique du VHC de génotype 1b, appelé ER-1b. Dans un premier temps, afin de vérifier la fonctionnalité du génome ER-1b, les cellules Huh-7 ont été transfectées par cet ARN. Les antigènes viraux Core et NS5B ont été détectés deux jours post-transfection montrant que l'ARN est traduit dans la cellule. Afin de prouver la validité de notre système, les résultats obtenus ont été comparés avec ceux du système répliatif de génotype 2a développé par Wakita et. al en 2005 [104].

Dans un second temps, la production de virus par les cellules transfectées par ER-1b a été démontrée. En effet 2 jours après inoculation avec le surnageant ER-1b, la présence des protéines virales Core et NS5B a été confirmée et l'ARN viral a été détecté. Les fluorescences obtenues pour les deux modèles de VHC, ER-1b et JFH1, étaient comparables. La caractérisation du virus ER-1b a permis de démontrer que ce virus est spécifique des cellules Huh-7 et des hépatocytes primaires humains. De plus, l'infection par ER-1b a été neutralisée à la fois par les anticorps anti-CD81 et ceux présents dans le sérum de patients infectés par le VHC. Des expériences de microscopie électronique sur des cellules infectées ont permis de

visualiser des pseudo-particules enveloppées avec une capsid au niveau de vacuoles lipidiques. Les particules, qui ont une taille d'environ 50 nm, ont aussi été retrouvées dans le milieu extracellulaire. Ainsi les virus ER-1b ont toutes les caractéristiques du VHC.

La production de virus par les cellules transfectées a été suivie pendant 15 jours en quantifiant l'ARN viral dans le surnageant. Un minimum a été observé à 2 jours post transfection ($3,7 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$ SEM copies/mL) et un maximum à 10 jours post-électroporation ($7,5 \times 10^4 \pm 8 \times 10^3$ SEM copies/mL). Bien que sur un période de 15 jours la production de virus se maintienne, celle-ci est beaucoup plus faible que la production de virus obtenue avec le modèle JFH1 [422]. Il y a une différence d'au moins deux \log_{10} entre les deux modèles. La quantité de virus ER-1b infectieux obtenus à 2 jours post- infection (de l'ordre de 10^3 FFU/mL) est aussi plus faible d'au moins un log [423]. Dans la perspective d'obtenir un clone ER-1b plus productif en virus infectieux, on pourrait faire une sélection de clones. Cela pourrait se faire, soit par construction de réplicon génomique ER-1b [228], soit en réalisant des passages successifs de cellules transfectées par ER-1b [424]. Ces expériences nous permettraient d'identifier des mutations adaptatives qui augmenteraient la réplication et la production virale d'ER-1b. Nous pourrions aussi introduire dans le génome des mutations dans NS3 [425], NS4B [426] et NS5A [424] connues pour augmenter l'efficacité de la réplication et de la production virale. Cette technique a récemment été utilisée par l'équipe du docteur Wakita mais n'a eu que très peu de succès [228]. L'utilisation d'une autre lignée cellulaire serait aussi à considérer [104].

Nous avons ainsi obtenu un système répliatif *in vitro* capable de produire des virus VHC de génotype 1b. Bien qu'ER-1b soit moins productif que JFH1, ce modèle est un outil important que j'ai utilisé dans les expériences sur les structures ARN du génome du VHC.

TRANSITION

Ainsi pendant ma première année de doctorat, j'ai développé et caractérisé le système répliatif en culture cellulaire ER-1b. J'ai ensuite utilisé ce système dans les deux articles étudiant les éléments structurels du génome du VHC et leur implication dans le cycle viral.

Les structures ARN présentes dans certains génomes viraux ont un rôle important dans la répliation du virus et sont appelées éléments CRE pour « Cis-acting Replication Element » [267]. Le VHC possède un génome à ARN simple brin de polarité positive. L'initiation de sa répliation a lieu dans son domaine 3' non traduit (3'UTR). Les études réalisées sur le 3'UTR du VHC ont montré que cette région est hautement structurée [320, 323]. Cependant, un grand nombre d'expériences ont été faites soit *in vitro* soit avec le fragment subgénomique du 3'UTR du VHC, ce qui ne représente pas les conditions biologiques permettant la répliation virale. Ainsi la résolution *in situ* de la structure secondaire du 3'UTR, dans un contexte de génome entier, améliorerait notre compréhension sur la répliation du VHC.

Dans l'article qui suit nous avons développé une méthode (voir schéma explicatif de la méthode dans l'annexe I) afin d'étudier *in situ* la présence d'éléments ARN simple brin et double brin dans le 3'UTR(+) du génome du VHC.

Chapitre 3 : Article 1

***IN SITU* LOCALIZATION OF SINGLE- AND DOUBLE-STRAND
RNA ELEMENTS CONTAINED IN THE HEPATITIS C VIRUS
GENOME 3'-UNTRANSLATED REGION**

Elodie Rance^{1,2†}, Jing Hu^{1†}, Jerome E. Tanner¹, Caroline Alfieri^{1,2*}

¹Laboratory of Viral Pathogenesis, Research Center, Sainte-Justine University Hospital, Montreal, QC, Canada; and ²Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

†The authors wish it to be known that, in their opinion, the first 2 authors should be regarded as joint First Authors.

Keywords: HCV, 3'UTR, structural RNA elements, (ds)RNA, (ss)RNA, DMS, psoralen

[**Status:** submission to the Nucleic Acids Research].

ABSTRACT

In plus-strand RNA viruses, such as hepatitis C virus (HCV), conformational changes in genomic structure are thought to regulate key life-cycle events. Replication of HCV RNA is controlled primarily by the 3'-untranslated region (3'UTR), a tripartite structure containing a variable region, a poly(U/UC) repeat region and a 98-nt terminal sequence. Attribution of functional roles to the structural elements contained within the 3'UTR of the intact HCV genome requires a method able to detect such structures inside the cell. *In situ* crosslinking with psoralen and nucleotide tagging with dimethyl sulfate (DMS) were used in combination with site-directed qPCR to localize respective double-strand (ds)RNA or single-strand (ss)RNA elements in the 3'UTR. The intracellular poly(U/UC) sequence formed a DMS-susceptible target, but only if the 3'UTR was presented as a fragment. However, when presented within the full-length genome, it became susceptible to psoralen-crosslinking, indicating that the poly(U/UC) formed a novel dsRNA structure comprised partly of sequences located outside the 3'UTR. Examination of dsRNA elements found in the 3'UTR terminal stem-loop structures by *in situ* psoralen-crosslinking suggests that HCV replication proteins interact tightly with these structures. These findings constitute the first biophysical evidence for the existence of ds and ssRNA elements in the HCV 3'UTR of the native HCV genome.

INTRODUCTION

The need to accurately determine secondary and tertiary RNA structures is key to our understanding of fundamental RNA structure-function relationships (1). Cellular RNA is thought to fold in a hierarchical manner with local canonical (Watson-Crick) and non-canonical base-base pairing first forming helical double-strand (ds) sequences interspersed with small intervening single-strand (ss) hairpin loops, internal bulges or junction loops composed of three or more individual RNA strands (2). This initial folding process is followed by tertiary contacts that serve to stabilize the overall configuration and to package the earlier-formed RNA helices (3). Final maturation is achieved when the RNA molecule reaches its lowest free-energy state (4).

Two broad approaches are commonly used conjointly to resolve RNA secondary structures, namely *in silico* assessment of lowest free-energy and chemical tagging of physically unpaired and presumed ss ribonucleotides (5). While *in silico* modeling has proven beneficial in predicting secondary motifs in smaller RNAs (100 to 200 bases), current algorithms lack the sophistication needed to accurately predict more complex tertiary base-pairings found in larger RNA molecules. Chemical tagging or footprinting of unpaired nucleotides is used to enhance the predictive value of *in silico* models (6-9); however this approach too has its limits. Chemical tagging cannot distinguish between a nucleotide contained within a ss sequence from one involved in unconventional base-pairing or which forms part of a tertiary interaction (10). Chemical tagging is generally constrained to study smaller *in vitro* synthesized RNAs and is best performed in buffered salt solution. These latter measures are to ensure sufficient and homogeneous starting material, and complete tagging of potential nucleotide targets. If the size of the RNA substrate were to increase, there is an

inherent risk of conformational trapping which results in higher-energy RNA permutations misrepresentative of the authentic RNA structure. Additionally, chemical tagging of RNA in buffered salts, devoid of RNA binding proteins, risks inappropriate nucleotide tagging and a possible over-presentation of ssRNA motifs. An assay system that can preserve and detect authentic ssRNA sequences as well as a system that can alternatively detect dsRNA structures in a large and structurally-native RNA is needed.

The hepatitis C virus (HCV) genome is a (+) strand RNA that encodes a single 9.6kb length open reading frame (ORF) that is flanked by highly-conserved 5'- and 3'-untranslated regions (UTR)(11). Conformational changes in HCV UTR structures are thought to act like molecular switches to transition the virus through its various replication stages (12). The 5'UTR is 341 nucleotides in length and comprised of at least three large stem-loop (SL) structures interspersed with multiple unpaired sequences and tertiary support structures. The 5'UTR is responsible for initial translation of the ORF (13). The HCV 3'UTR is a smaller and simpler tripartite structure comprised of a 27 to 70 base genotype-specific variable region (VR), a poly(U/UC) repeat sequence and a highly conserved 98-base sequence called the X-tail (11). The X-tail and the adjacent 26 to 62 nucleotide-length U/UC repeat sequence are thought to be essential for *in vitro* synthesis of the HCV (-) strand RNA and for virus infectivity of chimpanzees (14-17). The VR segment, while dispensable for *in vitro* (-) strand RNA synthesis, appears to enhance overall RNA replication (14;17). Lowest free-energy models, *in vitro* biochemical evidence and genetic mutations predict that the X-tail forms a stable terminal stem-loop (SL1) (16;18); however, the lack of clear *in vivo* physical evidence and conflicting computer model readouts for the leftward end of the 3'UTR X-tail segment has made an accurate determination of the 3'UTR X-tail structure challenging (19;20).

An examination of the secondary structures present in the HCV 3'UTR as it exists in its native cellular state could serve as a basis for understanding its functions inside the cell, as well as those of similar structures found in eukaryotic RNA. As an initial foray into detecting both native ds and ssRNA elements in a low abundance intracellular RNA species, we used *in situ* chemical crosslinking and nucleotide tagging, in combination with site-directed qPCR, to detect and demarcate dsRNA and ssRNA motifs contained within the 3'UTR sequence of an intracellular HCV genome. To our knowledge, the results described here constitute a first report for *in situ* probing and detection of secondary structures naturally present within the full-length HCV genome.

MATERIALS AND METHODS

Generation of HCV RNA.

Full-length HCV 1b genomic RNA was generated from the HCV RNA expression plasmid (p)ER-1b. pER-1b is a derivative of pGEM-7Zf-HCV 1b (21) with addition of the microRNA-122 complementary sequence (22) and the HCV 1b 3'UTR (cDNA template RNA for HCV 1b was provided by Dr Hugo Soudeyns, CHU Sainte-Justine, Montreal). Changes were introduced into the pGEM T7 RNA polymerase promoter GAATACAAGCTTGTAATACGACTCACTATAGCCAGCCCC to allow RNA transcription to start at the authentic HCV genome terminal guanine nucleotide (underlined). pER-1b was altered by site-directed mutagenesis to contain the NS5b RNA polymerase GDD→GND mutation (23) or to include an additional frame-shift mutation within the leftward

end of the NS2 coding sequence (see Tableau 3.1 for primer sequences and corresponding HCV genome positions, IDT DNA, Coralville, IA). The NS5b GND mutation was expected to maintain intracellular HCV RNA in a pre-replicative state by preventing viral polymerase synthesis of the (-)strand RNA replication intermediate and hence arresting subsequent viral replication (24). The NS2 frame-shift mutation gives rise to a non-functional truncated NS2 protein and a complete loss of viral replication proteins NS3, NS4a/b and NS5a/b. The predicted DNA sequences for pER-1b, pER-1b GND mutant and pER-1b NS2 mutant constructs were verified by DNA sequencing.

HCV wild-type and mutated genomic RNAs were initially synthesized with the MEGAscript T7 kit (Ambion-Applied Biosystems, Austin, TX) and 1 µg of XbaI-linearized mung bean nuclease-treated plasmid DNA (25;26). Various HCV 3'UTR RNA fragments were also synthesized using the MEGAscript T7 polymerase following an initial pfx high-fidelity PCR amplification step and using the HCV 3'UTR DNA and 3'UTR-specific primers (Tableau 3.1). RNA transcription reactions proceeded for 4 to 6 h at 37°C, followed by DNA template removal with RNase-free DNase (Ambion Inc.), organic extraction and ethanol precipitation. Genomic RNA and 3'UTR RNAs were verified for predicted size and product integrity by resolution in 0.8% to 1% formaldehyde-agarose gels (27).

Cell culture and folding of intracellular HCV RNA templates.

Ten micrograms of HCV genomic RNA or 3'UTR RNA fragment was single-pulse-injected (270 V and 960 µFD, BioRad Gene Pulser, Mississauga, ON) into 4×10^6 Huh-7 cells (the Huh-7 human hepatoma cell line was provided by Dr Tatsuo Takahashi, Health Science Research Resources Bank, Japan) (26;28). Following electroporation, Huh-7 cells were placed in 8 ml of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen, Burlington, ON)

supplemented with 10% FBS and antibiotics, and cultured for 6 to 12 h to allow viable cells time to attach to the culture plate. This culture period was expected to allow the injected HCV RNA sufficient time to synthesize its complete complement of viral proteins, and enable the injected RNA strand to associate with viral replication proteins and appropriate cellular RNA binding proteins (29;30) (Figure 3.1). Electroporation-damaged and non-viable unattached cells were removed and the remaining attached cells were trypsinized, pelleted through 5 ml of FBS, and washed three times with PBS to remove any residual extracellular HCV RNA. Cells were divided into aliquots of 1×10^6 cells/100 μ l in 10 mM Tris-saline buffer (pH 7.5) in preparation for *in situ* RNA crosslinking with aminomethyltrioxsalen (psoralen) or A/C ribonucleotide modification with dimethyl sulfate (DMS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Virus replication potential by pER-1b, pER-1b GND mutant or pER-1b NS mutant was assessed by the fluorescence-forming unit (ffu) assay (26;28). This assay enables detection of viral structural proteins, represented by core protein (using anti-HCV core monoclonal antibody 11-B3, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA), and non-structural proteins (NS), represented by NS5b protein (using anti-NS5b monoclonal antibody 1826, Santa Cruz Biotechnology Inc). All three HCV constructs were capable of synthesizing their particular complement of viral proteins by 12 h post-transfection (Figure 3.1); however only wild-type ER-1b RNA was capable of completing an entire replication cycle to produce infectious virions ($\sim 3 \times 10^4$ infectious units (IU)/ml).

In vitro and in situ crosslinking of dsRNA.

Aminomethyltrioxsalen (psoralen; Sigma-Aldrich) was chosen as a means to localize dsRNA elements in the HCV 3'UTR. This was based on the known ability of psoralen to freely penetrate living cells and form chemical crosslinks in dsRNA, while preserving its native RNA structures and its interactions with cognate binding proteins (31).

In vitro crosslinking by psoralen was performed after resuspending 4 µg of the 3'UTR RNA (HCV 1b nt 9380-9609) in 20 µl of RNA folding buffer (25 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ and 0.1 mM EDTA, pH 7.5), heating the RNA to 95°C for 5 min and allowing RNA folding in a two-series slow-cooling step. The first slow-cooling step consisted of a 5°C/2 min cooling and a 10 min stationary step at 65°C. The second slow-cooling step consisted of a 2.5°C/min cooling to a final temperature of 37°C. This protocol was expected to facilitate and maintain proper folding of the 3'UTR RNA into a homogeneous population of lowest free-energy structures (32). After RNA renaturation, freshly-made psoralen was added to a final concentration of 100µg/ml, and the samples were allowed to incubate at 37°C in the dark for 10 min prior to UV crosslinking.

In situ crosslinking by psoralen was performed on Huh-7 cells electroporated with the 3'UTR fragment or with the full-length HCV genome. The cells were seeded as 50 µl droplets on paraffin and placed on an ice bed. Cells were combined with psoralen (500 µg/ml final concentration) and incubated in the dark for 10 min to allow cell penetration and intercalation of psoralen into dsRNA in preparation for UV crosslinking (31).

In vitro and *in situ* RNA was crosslinked by irradiation with long-wave (365 nm) UV light for 30 min using a Spectrolinker XL-1000 UV crosslinker (Spectroline, Westbury, NY). Both RNA fragments and live cells were irradiated at a distance of 9 cm from the light source for an expected energy yield of 4000 µJ/cm².

In experiments to validate psoralen's specific recognition and crosslinking of dsRNA sequences but not ssRNA sequences, 3'UTR X-tail RNA, which consists almost entirely of dsRNA (Figure 3.2), was heated to 95°C for 5 min and slow-cooled to 70°C. X-tail RNA was then maintained at 70°C throughout the entire crosslinking procedure. This was expected to prevent dsRNA annealing of the X-tail helices (16;18). Following organic extraction and ethanol precipitation to remove free uncrosslinked psoralen, RNA was resuspended at 1 µg/µl in RNase-free water and stored at -80°C.

In vitro and in situ modification of ssRNA by dimethyl sulfate.

DMS was chosen over the more commonly used N-methylisatoic anhydride (NMIA) to best localize ssRNA elements in the HCV 3'UTR. This was based on the reported ability of DMS to readily penetrate living cells versus NMIA (33) Although NMIA is capable of tagging all four ribonucleotides, DMS seems to possess a comparable or superior accuracy in recognizing unpaired A/C ribonucleotides (34).

In vitro DMS modification of ssRNA was performed after resuspending 4 µg of the 3'UTR RNA fragment in 20 µl of RNA folding buffer, heating the RNA to 95°C for 5 min and refolding the RNA in the slow-cooling step procedure as outlined above. Fresh DMS solution was added to the RNA to achieve a final concentration of 105 mM, after which the RNA samples were incubated at 37°C for 30 min.

In situ RNA modification by DMS was performed on electroporated Huh-7 cells suspended in 100 µl PBS and to which DMS was added to a final concentration of 420 mM (35). Cells were incubated for 10 min with continuous mixing. *In vitro* and *in situ* DMS reactions were stopped by addition of 5 µl β-mercaptoethanol.

In experiments to validate DMS recognition of ssRNA sequences but not dsRNA sequences, the 3'UTR X-tail was heated to 95°C for 5 min and slow-cooled to 70°C. X-tail RNA was then maintained at 70°C throughout the entire DMS tagging procedure to prevent dsRNA annealing and allow free access of DMS to exposed A/C ribonucleotides.

Organic extraction and ethanol precipitation were used to remove unbound DMS and β -mercaptoethanol. Treated RNA was then resuspended at 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in RNase-free water and stored at -80°C.

Detection of ss and dsRNA.

Psoralen-crosslinked or DMS-modified RNA, in conjunction with a library of primers demarcating specific structural elements in the HCV 3'UTR (Tableau 3.I and Figure 3.2), were used to generate radiolabeled cDNA probes by RT-PCR. Both psoralen-crosslinking and DMS-modification are expected to block reverse transcriptase, thereby yielding abortive cDNA transcripts and leading to the effective loss of radiolabeled cDNA probe (34;36). ^{32}P -radiolabeled cDNA probes were generated from 40 ng of *in vitro* crosslinked/modified RNA or 500 ng of *in situ* crosslinked/modified RNA. Probes were synthesized in 25 μl of QuantiTect reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) kit buffer (Qiagen, Mississauga, ON) containing 0.5 μM of sense and antisense primers and spiked with 2 μl of [α ^{32}P]-dCTP (800Ci/mmol, 10mCi/ml Perkin-Elmer, Woodbridge, ON). The exact PCR cycle which was most reflective of psoralen crosslinking or DMS modification of 3'UTR RNA and, therefore, most efficient for future probe generation conditions was determined for each RNA sample from an initial RT-qPCR screening and the use of Probe 1 primers. Probe 1 primers encompass the entire 3'UTR region. Probe working conditions were assayed in the Stratagene Mx3000P QPCR unit (SABiosciences, Valenca, CA). For each probe set, individual

radiolabeled probes were generated from untreated (UT) RNA, RNA exposed to psoralen (P), RNA exposed to UV (UV), RNA exposed to both psoralen and UV (P + UV) or RNA modified with DMS. Individual probes were hybridized to Southern blots containing a 270 bp DNA fragment that encompassed the entire HCV 1b 3'UTR (37). Following a high stringency wash, blots were exposed to X-ray film and changes in band intensity measured using MacBiophotonics ImageJ software (Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Signal image units (IU) were based on 0.5 x 1 cm box-scans for individual blot bands and the IU calculated as the number of pixels/0.5 x 1 cm box, after subtraction of background pixels/0.5 x 1 cm box as measured from an autoradiograph area located outside blotted DNA gel lanes.

RNA computer modeling and molecular or statistical analysis.

HCV 3'UTR secondary structure predictions were performed using RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at>) (38) in conjunction with RNAstructure (<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb>) (39). RNA structures were graphed using the RNA visualization tool jViz.Rna 2.0 (<http://jviz.cs.sfu.ca/index.html>) (40). Selection of PCR primers and mutated HCV sequences was aided by the use of Vector NTI 8.0 software (Informax, Frederick, MD) (41). Statistical analysis was performed using PHStat2 statistical software package version 2.51.

RESULTS

Validation of ds and ssRNA detection reagents.

Prior to our examination of ss and dsRNA elements present *de novo* in the HCV 3'UTR, we characterized the specificity and the optimal working conditions for the dsRNA recognition reagent psoralen and for the ssRNA recognition reagent DMS. HCV 3'UTR X-tail RNA, which contains almost exclusively dsRNA (Figure 3.2), was exposed *in vitro* to increasing concentrations of psoralen, or to a fixed amount (105 nM) of DMS with increased incubation times (35). As shown in Figure 3.3 A and 3.3 C, increasing the amount of psoralen or increasing DMS incubation times resulted in a \log_{10} or greater reduction in the number of detectable HCV RNA copies when measured by RT-qPCR. From these *in vitro* experiments, we established the working psoralen concentration and incubation time for DMS as 340 nM and 30 min, respectively. Under these conditions we observed an average delay of three qPCR cycles for the 3'UTR X-tail RNA treated with psoralen or with DMS (Figure 3.3 B and 3.3 D). Since a one-cycle delay represents an approximate three-fold loss in PCR signal (42), these elected conditions were expected to generate quantifiable differences in probe labelling and subsequent probe signal intensity.

When the X-tail RNA fragment was psoralen-crosslinked at 37°C, we observed a 95% loss in signal intensity as compared to untreated RNA (Figure 3.3 E, 37°C, UT versus P+UV). The 95% decrease in Probe 3 signal intensity following psoralen-crosslinking contrasted with the high intensity signal of X-tail RNA exposed only to UV or psoralen (Figure 3.3 E, 37°C, UT versus P or UV). Compared to untreated RNA, X-tail RNA exposure to psoralen or UV alone showed reductions of only 11% and 30%, respectively.

In complement and contrast to psoralen, the high percentage of dsRNA in the X-tail precluded DMS reactivity (34). As shown in Figure 3.3 E, X-tail RNA incubated at 37°C and treated with DMS showed no significant reduction in Probe 3 radiolabeling and yielded band signal intensity similar to untreated X-tail RNA (Figure 3.3 E, 37°C, UT versus DMS).

In order to confirm our findings that DMS reacts specifically with unpaired nucleotides in ssRNA, and to further rule out the possibility that psoralen or DMS improperly adducted to ss or dsRNA, respectively, X-tail RNA was psoralen-crosslinked or DMS-treated at 70°C. This was expected to prevent dsRNA annealing within the X-tail and force the X-tail to maintain a ssRNA form. As shown in Figure 3.3 E, prevention of X-tail dsRNA formation during psoralen crosslinking resulted in only a 10% decrease in band signal intensity compared to untreated X-tail RNA (Figure 3.3 E, 70°C, UT versus P + UV). Conversely, X-tail RNA treated with DMS while maintained at 70°C caused significant DMS tagging and a marked loss of band signal intensity (Figure 3.3 E, 70°C, UT versus DMS).

Three additional experiments revealed that X-tail RNA treated with psoralen while maintained at 37°C versus 70°C resulted in a $98\% \pm 1.4\%$ loss in band signal intensity or only a $11\% \pm 5.7\%$ loss, respectively, compared to untreated RNA (Figure 3.3 F, UT versus psoralen + UV). Conversely, X-tail RNA treated with DMS at 37°C or 70°C resulted in a $24.5\% \pm 17.7\%$ loss in signal intensity or a $97\% \pm 1.4\%$ loss, respectively, compared to untreated RNA (Figure 3.3 F, UT versus DMS). Overall, we concluded that psoralen or DMS could be used to specifically and differentially recognize dsRNA or ssRNA when performed *in vitro* and at biological temperatures. We also noted that the average difference in band intensity for untreated RNA versus psoralen- or DMS-treated RNA was 32.8 image units (IU) ± 1.82 SD ($n = 6$). From this statistic, it was determined that a reduction in signal intensity of $\geq 60\%$ would

exceed the lower limit at the 95% confidence level and allow for the accurate identification of dsRNA or ssRNA.

In vitro mapping of dsRNA structures contained within the 3'UTR.

Consensus prediction from RNAfold and RNAstructure algorithms indicates that the HCV ER-1b 3'UTR VR forms a small four-G:C-pair stem. No dsRNA structures were predicted for the poly(U/UC) repeat, and the X-tail could contain up to three dsRNA stem-loop structures (Figure 3.2). By convention, we designated the X-tail stem loop structures as SL1 (nt 9564-9609), SL2 (nt 9534-9560) and SL3 (nt 9512-9532) (43).

Hybridization of a DNA fragment representing the entire 3'UTR sequence with a library of cDNA radiolabeled probes generated after *in vitro* psoralen treatment and encompassing the entire 3'UTR sequence (Probe 1), the 3'UTR sequence lacking the SL1 sequence (Probe 2), sequences representing only the X-tail (Probe 3) or sequences containing only the VR and poly(U/UC) repeat (Probe 4), showed a 96% reduction in band signal intensity for probes 1 to 3 (Figure 3.4, left panels, UT versus P + UV). No statistical loss (28%) in signal intensity was observed using probe 4 (Figure 3.4 left panels, UT versus P+UV). These results indicate that dsRNA elements are uniquely present in the X-tail sequence. No dsRNA sequences were evident in the VR-poly(U/UC) repeat sequence. Results for probe 2 also indicated that, beyond the stable terminal SL1 structure, psoralen crosslinking also detected dsRNA within the SL2-SL3 region. The inability to detect the G:C stem located in the VR may be due to its instability at 37°C as the VR G:C stem has a predicted melting temperature of 32°C.

DMS modification recognized the poly(U/UC) repeat sequence but did not react with the X-tail (Figure 3.4 right panels, Probes 1, 2 and 4 versus Probe 3). This was not unexpected as

computer models predict that the X-tail is comprised almost exclusively of dsRNA whereas no dsRNA is predicted for the poly(U/UC) repeat sequences (Figure 3.2). These results further validate the capacity of psoralen and DMS to differentially recognize dsRNA or ssRNA sequences, respectively.

In situ detection of dsRNA and ssRNA structures contained within the HCV 3'UTR RNA fragment.

Compared to *in vitro* conditions, the concentration of 3'UTR ds or ssRNA targets for intracellular HCV genomic RNA was expected to be orders of magnitude lower than that of competing cellular ds and ssRNA species (44;45). We therefore established optimal working conditions for psoralen and DMS to sufficiently crosslink or tag dsRNA or ssRNA sequences within the 3'UTR and as they existed *in situ* within the HCV genome. Addition of increased amounts of psoralen or DMS to 10^6 Huh-7 cells containing transfected HCV genomic RNA to levels greater than 1.7 mM and 420 mM, respectively, resulted in 99% and 84% reduction in detectable HCV genome copies as measured by RT-qPCR (Figure 3.5, graphs A and C). Under these conditions, we routinely observed an average delay of three PCR cycles after psoralen treatment and an average delay of two PCR cycles after DMS treatment (Figure 3.5, graphs B and D).

In its native setting the HCV 3'UTR would be expected to mimic RNA structures naturally found in its host cell RNA and bind virus-essential cellular RNA binding proteins (46). In order to determine whether the ds and ssRNA elements observed under *in vitro* treatment conditions, and devoid of RNA binding proteins, are impacted by cellular RNA binding proteins (47), parallel experiments were performed in which the 3'UTR RNA fragment was psoralen-crosslinked or DMS-modified *in vitro*, or was first injected into cells and allowed

sufficient time to complex with cellular RNA binding proteins prior to *in situ* psoralen-crosslinking or DMS modification. As evidenced by the significant loss in signal intensity for Probes 1 to 3 ($\geq 96\%$) in cells treated with psoralen (Figure 3.6, panels B and D) and the small loss in signal intensity for Probe 4 (less than 26%) (Figure 3.6, panels B and D), it appears that *in situ* the dsRNA elements are located in the X-tail and located in both the SL1 sequence and sequences comprising SL2 and SL3. The lack of signal intensity change observed for Probe 4 indicates that the *in situ* poly(U/UC) repeat sequence contains no detectable dsRNA (Figure 3.6, Probe 4). Comparison of the *in vitro* and *in situ* DMS-modified 3'UTR fragment complemented our psoralen findings by revealing that the poly(U/UC) repeat RNA sequence was susceptible to DMS modification (70% to 89% reduction for DMS, Probes 1, 2 and 4, Figure 3.6 panels B and D), whereas X-tail sequences remained resistant to DMS modification (Probe 3, less than 22% reduction in signal, Figure 3.6, panels B and D).

These results further support the postulate that ssRNA dominates the poly(U/UC) repeat both *in vitro* and *in situ*, while dsRNA sequences are concentrated to the X-tail. Since the findings for the *in vitro* modified 3'UTR RNA fragment closely matched those obtained when the 3'UTR RNA was modified *in situ*, this suggests that the inherent formation of ds and ssRNA elements in the 3'UTR fragment sequence are not significantly altered by the presence of host cell RNA binding proteins.

In situ detection of ds and ssRNA structures contained within the 3'UTR sequence of the HCV genome.

Although our *in vitro* and *in situ* results for the 3'UTR RNA fragment were similar and compared favorably with prior studies that employed 3'UTR fragments (19), the use of subgenomic fragments does not preclude, or allow detection of, more distant secondary interactions that might occur between the 3'UTR sequence and its neighboring NS5b sequence or with sequences located distally in the 5'UTR (48-51). *In situ* psoralen treatment of the entire HCV genome at 8-12 h post-transfection yielded $\geq 89\%$ reduction in band intensity for Probes 1, 2 and 4 but, unlike the reduction in Probe 3 reactivity observed with the 3'UTR fragment (Figure 3.6), Probe 3 was reduced by only 27% (Figure 3.7). Further, psoralen treatment of the HCV genome now revealed a unique dsRNA element that formed within the VR-poly(U/UC) repeat that was not seen when we employed the 3'UTR fragment (Figure 3.7, Probe 4). By contrast, *in situ* treatment of the HCV genome with DMS only complemented our findings for the 3'UTR fragment (Figures 3.6 and 3.7, DMS). DMS still showed that ssRNA elements dominate the poly(U/UC) repeat (Figures 3.6 and 3.7, Probe 4), while they are not significantly detectable in the X-tail (Figures 3.6 and 3.7, Probe 3).

As measured by Probe 3, the genomic X-tail, but not the X-tail in the 3'UTR fragment, appeared uniquely resistant to *in situ* psoralen treatment (Figures 3.6 and 3.7, Probe 3). This could be due to the possibility that the X-tail naturally adopted a more unpaired or open conformation or that psoralen was in some manner occluded from X-tail dsRNA access. Since the HCV RNA genome employed in our *in situ* psoralen-crosslinking studies was capable of producing a complete set of viral replication proteins (Figure 3.1), we tested whether psoralen was blocked from accessing X-tail dsRNA sequences by HCV replication proteins. We employed a HCV NS2 frame-shift construct that could express the virion structural proteins

including the capsid/core protein but could not express the replication complex proteins NS2, NS3, NS4a/b and NS5a/b proteins (Figure 3.1). A re-examination of X-tail dsRNA accessibility to psoralen at 12 h post-transfection revealed that an absence of viral replication complex proteins allowed psoralen access to X-tail dsRNA (Figure 3.8, Probe 3). This observed occlusion of psoralen by viral replication proteins (Figure 3.7) and the ability of psoralen to access the X-tail when viral proteins were absent (Figures 3.6 and 3.8) support the view that the viral NS proteins comprising the replication complex tightly cover X-tail sequences, and that host cell RNA binding proteins are less bound and protective of X-tail dsRNA.

DISCUSSION

The capacity to resolve RNA secondary and tertiary structures present in their native state is key to a better understanding of their contribution to cellular RNA processing pathways (52). Currently available tools to validate *in silico* RNA modeling are largely limited to *in vitro* tagging of unpaired ssRNA sequences (8). In this study, we developed an assay platform that can differentially detect ssRNA and dsRNA elements contained in naturally-formed intracellular RNA. Use of psoralen and DMS also allows the gathering of both complementary and confirmatory data on predicted dsRNA and ssRNA elements, which should enhance and better validate the prediction capabilities of current RNA folding algorithms (5). Unlike current chemical modification methods that assume accurate RNA folding and maturation for a particular RNA species suspended in buffered salt solutions, *in situ* treatment of properly folded intracellular RNA that is naturally complexed with its cognate RNA binding proteins

circumvents any *in vitro* biases and artefacts. Under physiologic conditions, we observed that both psoralen and DMS freely penetrate live cells, and could recognize ds and ssRNA, respectively, without disrupting RNA-protein interactions (Figure 3.7 and 3.8). Current chemical tagging requires relatively large amounts of starting material to faithfully tag and measure ssRNA targets. The use of *in situ* nucleotide modifications, in concert with RT-PCR and a library of selected primers, allows one to detect and demarcate secondary structures for RNA species found in minute quantities as intracellular RNA (Figures 3.7 and 3.8). As shown by our detection of a dsRNA element in the poly(U/UC) repeat when using genomic RNA, *in situ* modification and differentially-acting nucleotide modifiers allow for the discovery of RNA interactions that are unable to be recognized by currently used ssRNA modifying agents (Figure 3.7, psoralen versus DMS).

The HCV 3'UTR is a highly conserved tripartite structure that is essential for synthesis of the HCV (-) strand RNA intermediate and for virus infectivity (14-17). Attempts to resolve the native structure of the 3'UTR are based largely on subgenomic fragments which do not take into account potential interactions with more distant HCV sequences (48-51). While we observed, from both *in vitro* and *in situ* modification of the 3'UTR fragment, that the overall positioning of dsRNA (Figures 3.6 and 3.8, Probe 3, P + UV) and ssRNA sequences (Figures 3.6 and 3.7) held true with earlier reports on the structures of the X-tail and the VR-poly(U/UC) repeat (19;20), *in situ* psoralen-crosslinking of the HCV genome and subsequent probe analysis of the VR-poly(U/UC) revealed an unpredicted dsRNA interaction. When the VR-poly(U/UC) repeat was examined as part of the HCV genome, we observed a 95% reduction in band signal intensity after *in situ* psoralen treatment (Figure 3.7 Probe 4, P + UV), indicating the presence of dsRNA. We speculate that the dsRNA formed in the VR-poly(U/UC) repeat may be a union with unknown RNA sequence located outside the 3'UTR. Although the VR sequence and much

of the poly(U/UC) repeat tract are thought to be nonessential for RNA synthesis, it has been shown that a longer poly(U/UC) repeat imparts a replicative advantage to HCV in experimentally infected chimpanzees, and enhances 3'UTR-directed (-) strand synthesis when tested *in vitro* (14;15;53;54). A scan of the VR-poly(U/UC) sequence for complementary sequences located outside the 3'UTR and in the HCV genome revealed a VR-poly(U/UC) sequence 9387-**ACACUCCAGGCC**-9398 located proximal to the small GC stem (Figure 3.2) that could anneal (**bold**) to NS5b sequences located to the right of SL9033, sequence 9107-**GGCCAGGAGCGU**-9119 (55). No other sequences in the VR-poly(U/UC) repeat showed significant complementarity to sequences in the HCV genome or to human sequences (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). While further work is needed to support our contention, a recent report suggests that sequences near 9107-GGCCAGGAGCGU-9119 along with NS5b SL9266 form a structural switch with the ability to change HCV RNA from a translation template to a replication template (56).

The results presented in this paper serve to elucidate the structural dynamics occurring in the HCV genome during replication, and provide insight on how similar structures found in eukaryotic RNAs also function. The differing *in vitro* and *in vivo* findings reinforce the importance of performing RNA structure analyses *in situ* using full-sized RNA rather than *in vitro* with truncated transcripts. Further, the methodology presented in this study, namely *in situ* RNA modification with two different types of RNA modifiers to identify native ss and dsRNA structures, constitutes a valuable tool that should improve secondary structure prediction and aid in the identification of tertiary interactions for complex RNA.

ACKNOWLEDEMENTS

We thank Dr Hugo Soudeyns (CHU Sainte-Justine, Canada) for providing the HCV 1b template RNA, and Dr Tatsuo Takahashi (Health Science Research Resources Bank, Japan) for the Huh-7 human hepatoma cell line).

FUNDING

This work was funded, in part, by the Canadian Institutes for Health Research grant #82572 to CA. ER was supported through graduate scholarships from the Department of Microbiology and Immunology, and from the Faculty of Graduate Studies, University of Montreal. Funding for open access charge: University of Montreal.

REFERENCES

1. Holbrook,S.R. (2005) RNA structure: the long and the short of it. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 302-308.
2. Hendrix,D.K., Brenner,S.E. and Holbrook,S.R. (2005) RNA structural motifs: building blocks of a modular biomolecule. *Q. Rev. Biophys.*, **38**, 221-243.
3. Holbrook,S.R. (2008) Structural principles from large RNAs. *Annu. Rev. Biophys.*, **37**, 445-464.
4. Woodson,S.A. (2010) Compact intermediates in RNA folding. *Annu. Rev. Biophys.*, **39**, 61-77.
5. Deigan,K.E., Li,T.W., Mathews,D.H. and Weeks,K.M. (2009) Accurate SHAPE-directed RNA structure determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A*, **106**, 97-102.
6. Tullius,T.D. and Greenbaum,J.A. (2005) Mapping nucleic acid structure by hydroxyl radical cleavage. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 127-134.
7. Prediger,E.A. (2001) Detection and quantitation of mRNAs using ribonuclease protection assays. *Methods Mol. Biol.*, **160**, 495-505.
8. Merino,E.J., Wilkinson,K.A., Coughlan,J.L. and Weeks,K.M. (2005) RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE). *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4223-4231.

9. Wilkinson,K.A., Gorelick,R.J., Vasa,S.M., Guex,N., Rein,A., Mathews,D.H., Giddings,M.C. and Weeks,K.M. (2008) High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states. *PLoS. Biol.*, **6**, e96.
10. Bindewald,E., Wendeler,M., Legiewicz,M., Bona,M.K., Wang,Y., Pritt,M.J., Le Grice,S.F. and Shapiro,B.A. (2011) Correlating SHAPE signatures with three-dimensional RNA structures. *RNA.*, **17**, 1688-1696.
11. Lemon,S.M., Walker,C.M., Alter,M.J. and Yi,M. (2007) Hepatitis C virus. In Knipe,D.M. and Howley,P.M. (eds.), *Virology, Fields*. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1253-1304.
12. Schroeder,S.J. (2009) Advances in RNA structure prediction from sequence: new tools for generating hypotheses about viral RNA structure-function relationships. *J. Virol.*, **83**, 6326-6334.
13. Guber,D., Kuno,G. and Markoff,L. (2007) Flaviviruses. In Knipe,D.M. and Howley,P.M. (eds.), *Virology, Fields*. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1153-1252.
14. Yi,M. and Lemon,S.M. (2003) 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.*, **77**, 3557-3568.
15. Kolykhalov,A.A., Mihalik,K., Feinstone,S.M. and Rice,C.M. (2000) Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J. Virol.*, **74**, 2046-2051.

16. Yi,M. and Lemon,S.M. (2003) Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA*, **9**, 331-345.
17. Friebe,P. and Bartenschlager,R. (2002) Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J. Virol.*, **76**, 5326-5338.
18. Oh,J.W., Sheu,G.T. and Lai,M.M. (2000) Template requirement and initiation site selection by hepatitis C virus polymerase on a minimal viral RNA template. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17710-17717.
19. Dutkiewicz,M. and Ciesiolka,J. (2005) Structural characterization of the highly conserved 98-base sequence at the 3' end of HCV RNA genome and the complementary sequence located at the 5' end of the replicative viral strand. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 693-703.
20. Ito,T. and Lai,M.M. (1997) Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *J. Virol.*, **71**, 8698-8706.
21. Takamizawa,A., Mori,C., Fuke,I., Manabe,S., Murakami,S., Fujita,J., Onishi,E., Andoh,T., Yoshida,I. and Okayama,H. (1991) Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.*, **65**, 1105-1113.
22. Jopling,C.L., Yi,M., Lancaster,A.M., Lemon,S.M. and Sarnow,P. (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, **309**, 1577-1581.

23. Kato,T., Date,T., Miyamoto,M., Furusaka,A., Tokushige,K., Mizokami,M. and Wakita,T. (2003) Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, **125**, 1808-1817.
24. Targett-Adams,P., Boulant,S. and McLauchlan,J. (2008) Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.*, **82**, 2182-2195.
25. Wakita,T., Pietschmann,T., Kato,T., Date,T., Miyamoto,M., Zhao,Z., Murthy,K., Habermann,A., Krausslich,H.G., Mizokami,M. *et al.* (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.*, **11**, 791-796.
26. 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**, 2334-2339.
27. Trepanier,J.B., Tanner,J.E. and Alfieri,C. (2008) Reduction in intracellular HCV RNA and virus protein expression in human hepatoma cells following treatment with 2'-O-methyl-modified anti-core deoxyribozyme. *Virol.*, **377**, 339-344.
28. Rance,E., Tanner,J.E. and Alfieri,C. (2012) Inhibition of IkappaB kinase by thalidomide increases hepatitis C virus RNA replication. *J. Viral Hepat.*, **19**, e73-e80.
29. Kato,T., Matsumura,T., Heller,T., Saito,S., Sapp,R.K., Murthy,K., Wakita,T. and Liang,T.J. (2007) Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J. Virol.*, **81**, 4405-4411.

30. Heller,T., Saito,S., Auerbach,J., Williams,T., Moreen,T.R., Jazwinski,A., Cruz,B., Jeurkar,N., Sapp,R., Luo,G. *et al.* (2005) An in vitro model of hepatitis C virion production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 2579-2583.
31. Calvet,J.P. and Pederson,T. (1979) Heterogeneous nuclear RNA double-stranded regions probed in living HeLa cells by crosslinking with the psoralen derivative aminomethyltrioxsalen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 755-759.
32. Fabian,M.R. and White,K.A. (2008) Solution structure probing of RNA structures. *Methods Mol. Biol.*, **451**, 243-250.
33. Paillart,J.C., Dettenhofer,M., Yu,X.F., Ehresmann,C., Ehresmann,B. and Marquet,R. (2004) First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. *J. Biol. Chem.*, **279**, 48397-48403.
34. Cordero,P., Kladwang,W., Vanlang,C.C. and Das,R. (2012) Quantitative dimethyl sulfate mapping for automated RNA secondary structure inference. *Biochemistry*, **51**, 7037-7039.
35. Fernandez-Miragall,O. and Martinez-Salas,E. (2007) In vivo footprint of a picornavirus internal ribosome entry site reveals differences in accessibility to specific RNA structural elements. *J. Gen. Virol.*, **88**, 3053-3062.
36. You,S., Falgout,B., Markoff,L. and Padmanabhan,R. (2001) In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure. *J. Biol. Chem.*, **276**, 15581-15591.

37. Sambrook,J., Fritsch,E.F. and Maniatis,T. (1989) Hybridization of radiolabelled probes to immobilized nucleic acids. In Nolan,C. (ed.), *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, p. 9.47-9.59.
38. Hofacker,I.L. (2009) RNA secondary structure analysis using the Vienna RNA package. *Curr. Protoc. Bioinformatics.*, **Chapter 12**, Unit12.
39. Reuter,J.S. and Mathews,D.H. (2010) RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC. Bioinformatics.*, **11**, 129.
40. Fera,D., Kim,N., Shiffeldrim,N., Zorn,J., Laserson,U., Gan,H.H. and Schlick,T. (2004) RAG: RNA-As-Graphs web resource. *BMC. Bioinformatics.*, **5**, 88.
41. Rychlik,W., Spencer,W.J. and Rhoads,R.E. (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6409-6412.
42. Bustin,S.A. (2004) *A-Z of Quantitative PCR*. International University line, La Jolla, Ca.
43. Blight,K.J. and Rice,C.M. (1997) Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol.*, **71**, 7345-7352.
44. Shen,C.K. and Hearst,J.E. (1978) Chromatin structures of main-band and satellite DNAs in *Drosophila melanogaster* nuclei as probed by photochemical cross-linking of DNA with trioxsalen. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42 Pt 1**, 179-189.
45. Calvet,J.P. and Pederson,T. (1979) Photochemical cross-linking of secondary structure in HeLa cell heterogeneous nuclear RNA in situ. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 1993-2001.

46. Moriishi,K. and Matsuura,Y. (2007) Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.*, **17**, 343-354.
47. Harris,D., Zhang,Z., Chaubey,B. and Pandey,V.N. (2006) Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Mol. Cell Proteomics.*, **5**, 1006-1018.
48. Song,Y., Friebe,P., Tzima,E., Junemann,C., Bartenschlager,R. and Niepmann,M. (2006) The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J. Virol.*, **80**, 11579-11588.
49. Ito,T., Tahara,S.M. and Lai,M.M. (1998) The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J. Virol.*, **72**, 8789-8796.
50. McCaffrey,A.P., Ohashi,K., Meuse,L., Shen,S., Lancaster,A.M., Lukavsky,P.J., Sarnow,P. and Kay,M.A. (2002) Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice. *Mol. Ther.*, **5**, 676-684.
51. Romero-Lopez,C. and Berzal-Herranz,A. (2009) A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *RNA.*, **15**, 1740-1752.
52. Fabian,M.R., Sonenberg,N. and Filipowicz,W. (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 351-379.
53. Yanagi,M., St,C.M., Emerson,S.U., Purcell,R.H. and Bukh,J. (1999) In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 2291-2295.

54. You,S. and Rice,C.M. (2008) 3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). *J. Virol.*, **82**, 184-195.
55. Diviney,S., Tuplin,A., Struthers,M., Armstrong,V., Elliott,R.M., Simmonds,P. and Evans,D.J. (2008) A hepatitis C virus cis-acting replication element forms a long-range RNA-RNA interaction with upstream RNA sequences in NS5B. *J. Virol.*, **82**, 9008-9022.
56. Tuplin,A., Struthers,M., Simmonds,P. and Evans,D.J. (2012) A twist in the tail: SHAPE mapping of long-range interactions and structural rearrangements of RNA elements involved in HCV replication. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 6908-6921.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 3.1. Expression of viral proteins in HCV genome mutants.

Expression of HCV core (left column) and NS5b (right column) proteins at 18 h post-transfection in mock-transfected Huh-7 cells (Mock) or Huh-7 cells transfected with HCV GND mutant RNA (GND mut) or HCV NS mutant RNA (NS mut).

Figure 3.2. Secondary structure diagrams of HCV 1b 3'UTR tripartite structure.

Shown are the variable region (VR, nt 9380-9410), the 98 nt poly(U/UC) repeat (nt 9414-9511) and the X-tail (nt 9512-9609) containing SL1 to SL3. RNAfold and RNAstructure lowest free-energy models depict the X-tail as having three SL motifs (top) or two SL motifs (bottom). Gray shading indicates areas of predicted nucleotide pairings.

Figure 3.3. *In vitro* recognition modification of the HCV 3'UTR X-tail RNA fragment by psoralen or dimethyl sulfate.

The HCV 3'UTR X-tail RNA fragment was exposed to increasing concentrations of psoralen (A) or increased incubation times for 105 mM dimethyl sulfate (C). The relative level of psoralen RNA crosslinking or DMS modification of X-tail RNA was assessed by RT-qPCR and Probe 3 and plotted as % reduction (\log_{10}) in RNA copies, as compared to no treatment. Representative Ct profile plots for optimal qPCR cycle times showing cycle delays for psoralen (B) or DMS (D). For psoralen treatment: untreated (○), psoralen (□), UV (△) and psoralen + UV (◆). For DMS treatment: untreated (●) and DMS (■). (E) Visualization of ss and dsRNA for the untreated HCV 3'UTR X-tail (UT) or HCV 3'UTR X-tail incubated at 37°C (top panels) or 70°C (bottom panels) and treated with 340 nM psoralen (P), 365 nm ultraviolet light (UV),

psoralen and ultraviolet light (P + UV) or 105 mM DMS. Southern blots containing 3'UTR X-tail DNA were individually hybridized with ³²P-labeled probes generated by RT-qPCR and Probe 3 primers. (F) Average band intensity \pm SD and with corresponding t-test p-values (<0.001, ***) for three separate experiments for RNA modifications performed at 37°C (black column) or 70°C (clear column). dRn = delta normalized reporter signal as determined by ROX dye reading.

Figure 3.4. Detection of ss and dsRNA elements in the HCV 1b 3'UTR fragment.

The HCV 1b 3'UTR fragment was mock-treated *in vitro* at 37°C (UT) or exposed to 340 nM psoralen (P), ultraviolet light $\lambda=365$ nm (UV), psoralen and UV light (P + UV) or 105 mM dimethyl sulfate (DMS). Southern blots containing 3'UTR DNA were individually probed with ³²P-labeled cDNAs (Probes 1 to 4) generated by RT-qPCR.

Figure 3.5. *In vivo* exposure of HCV 1b to psoralen or DMS.

Huh-7 cells transfected with full-length HCV 1b RNA were exposed to increasing amounts of psoralen (A) or DMS (C) at 6 h post-transfection. The relative level of psoralen RNA crosslinking or DMS modification of HCV RNA was assessed by RT-qPCR and plotted as % reduction (\log_{10}) in RNA copies, compared to no treatment. The extent of RNA modification for psoralen-treated (B) or DMS-treated (D) cells was determined by using Probe 1 primers and RT-qPCR (Right). (B) Representative Ct profile for psoralen treatment: untreated (\blacktriangle), psoralen (\bullet), UV (\blacksquare) and psoralen + UV (\blacklozenge). (D) Representative Ct profile for DMS treatment: untreated (\bullet) and DMS (\blacksquare). dRn = delta normalized reporter signal as determined by ROX dye reading.

Figure 3.6. Comparison of *in vitro* and *in situ* recognition of ss and dsRNA elements contained within the 3'UTR RNA fragment.

(A) The HCV 1b 3'UTR fragment was exposed *in vitro* to 340 nM psoralen (P) or 52 mM DMS (DMS). (B) Huh-7 cells transfected with the HCV 1b 3'UTR fragment were exposed to 1.7 mM psoralen or 420 mM DMS at 12 h post-transfection. Southern blots containing 3'UTR DNA were individually probed with ³²P-labeled cDNAs (Probes 1 to 4) and relative band intensity for psoralen-treated (P + UV) or DMS-treated (DMS) RNAs were compared to untreated RNAs (UT). Average band intensity from four separate experiments for *in vitro* treatments (C) or *in situ* treatments (D) was plotted \pm SD, and corresponding t-test p-values were determined (* < 0.05, <0.01, **, <0.001, ***).

Figure 3.7. Detection of intracellular ss and dsRNA elements in the 3'UTR for the HCV 1b genome.

Huh-7 cells transfected with the HCV 1b genome containing the NS5b polymerase GND mutation were exposed to 1.7 mM psoralen or 420 mM DMS at 12 h post-transfection. (A) Southern blots containing 3'UTR DNA were individually probed with ³²P-labeled cDNAs (Probes 1 to 4) and relative band intensities for psoralen-treated (P + UV) or DMS-treated (DMS) RNA were compared to untreated RNA (UT). (B) Average band intensity for three separate experiments was plotted \pm SD, and corresponding t-test p-values were determined (<0.01, **, <0.001, ***).

Figure 3.8. Detection of the dsRNA elements in the 3'UTR X-tail for HCV 1b NS mutant genome.

Huh-7 cells transfected with the HCV 1b genome containing NS5b polymerase GND and NS ablation mutation were exposed to 1.7 mM psoralen at 12 h post-transfection. (A) Southern blots containing 3'UTR DNA were individually probed with ³²P-labeled cDNAs (Probes 1 to 4) and relative band intensities for psoralen-treated (P + UV) or DMS-treated (DMS) RNA were compared to untreated RNA (UT). (B) Average band intensity for three separate experiments was plotted \pm SD, and corresponding t-test p-values were determined (<0.001, ***).

FIGURES AND TABLES

Tableau 3.I

Table 1

Probe oligonucleotide sequences

Probe 1-9380-9404-Sense (S)	GAG CTA AAC ACT CCA GGC CAA TAG G
Probe 1-9588-9607 Antisense (AS)	ATG ATC TGC AGA GAG GCC AG
Probe 2-9380-9404- S	GAG CTA AAC ACT CCA GGC CAA TAG G
Probe 2-9546-9565-AS	GCG GCT CAC GGA CCT TTC AC
Probe 3-9509-9528-S	TTT GGT GGC TCC ATC TTA GC
Probe 3-9588-9607 AS	ATG ATC TGC AGA GAG GCC AG
Probe 4-9380-9404-S	GAG CTA AAC ACT CCA GGC CAA TAG G
Probe 4-9509-9528-AS	GCT AAG ATG GAG CCA CCA AA
GND mutant 8541-8561	GTT AAC GGA <u>A</u> AC GAC CTC GTC
NS2 mutant 3025/3026	CCA TTC TAA TTG CCA T AC TCG GTC C

Figure 3.1

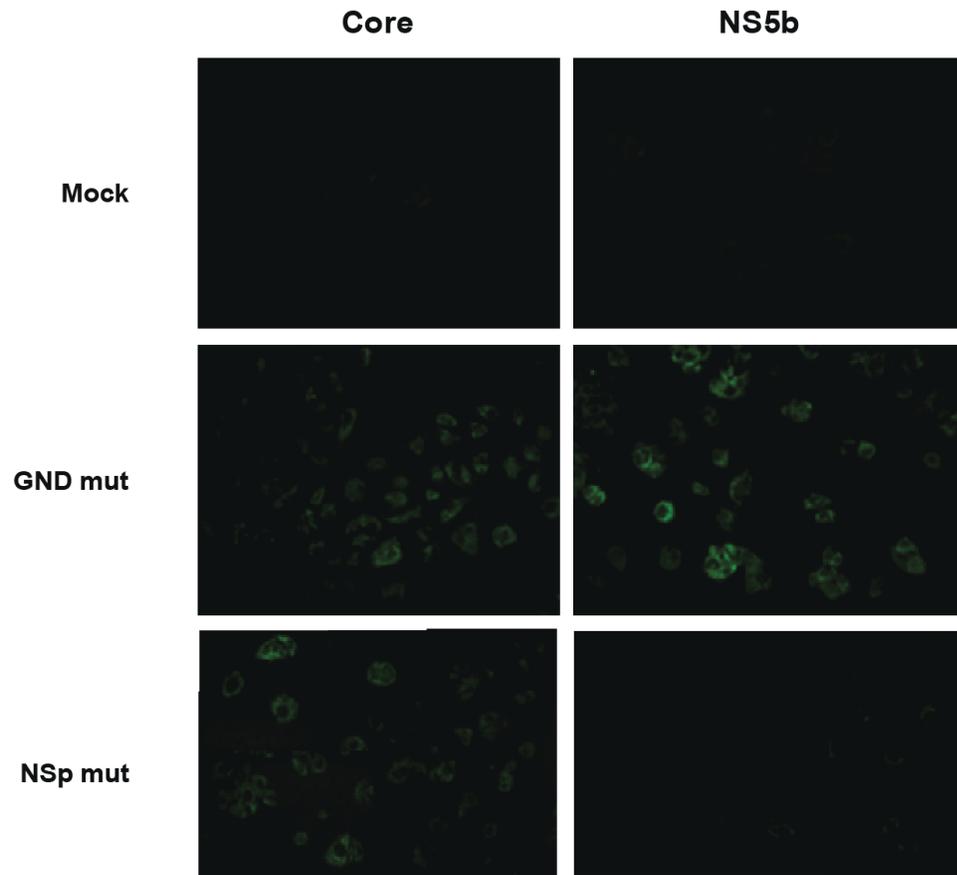
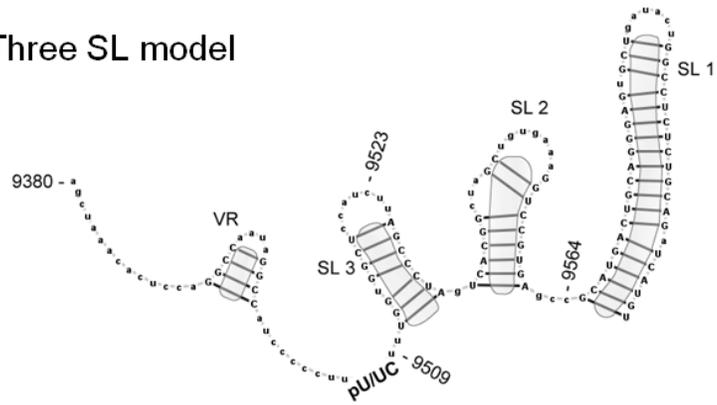


Figure 3.2

Three SL model



Two SL model

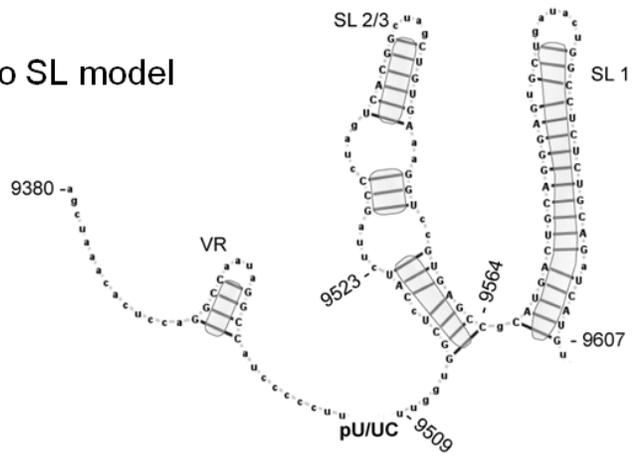


Figure 3.3

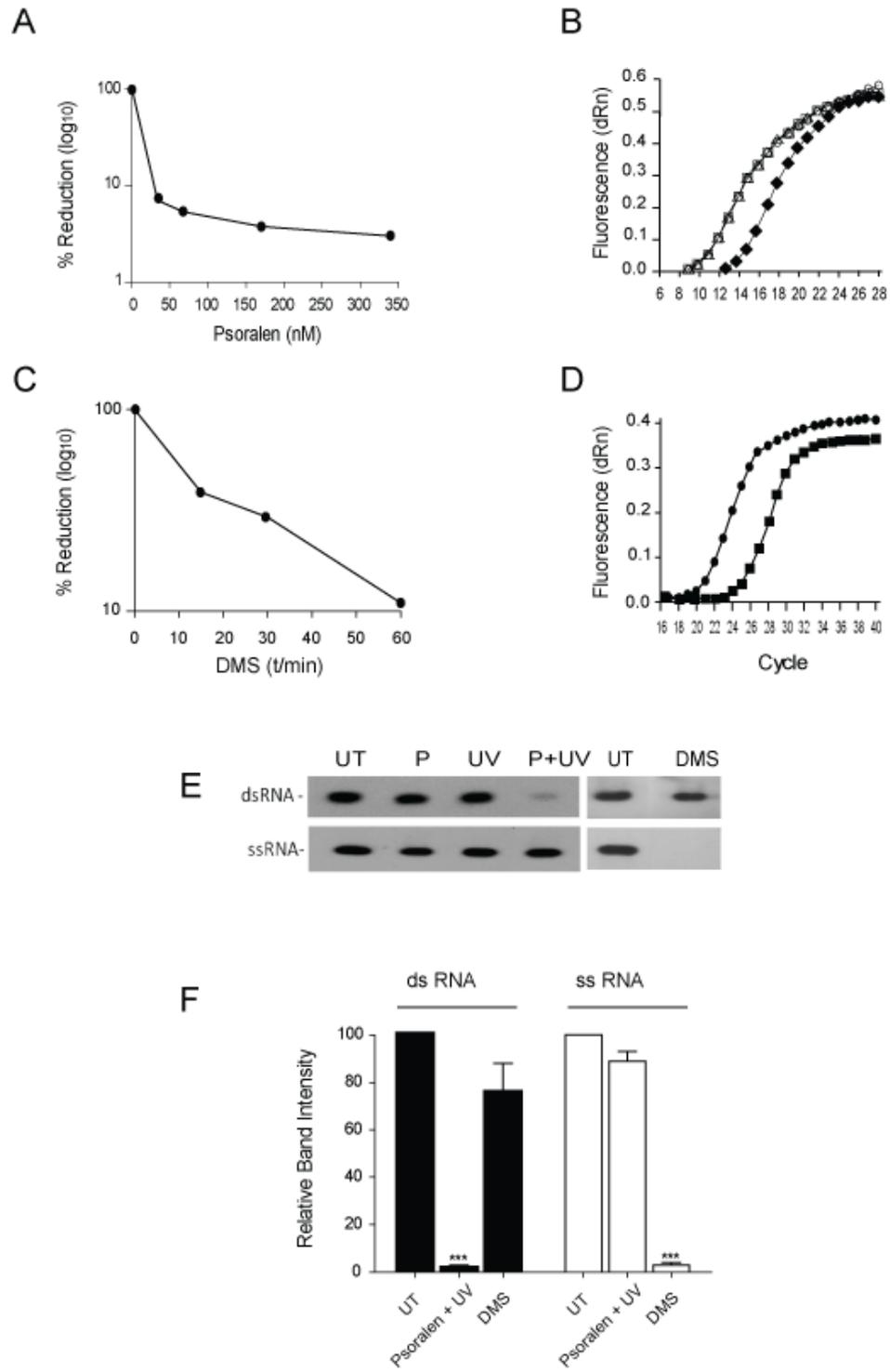


Figure 3.4

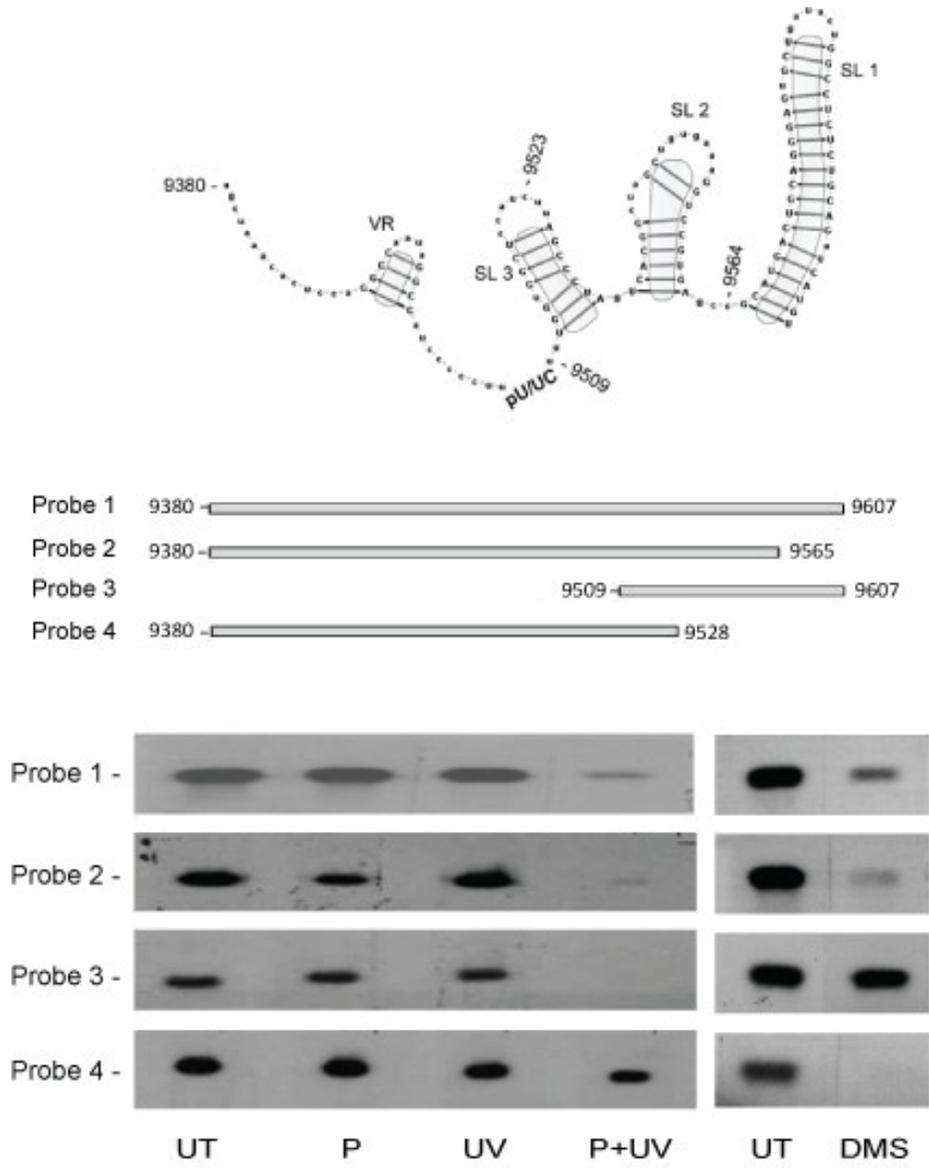


Figure 3.5

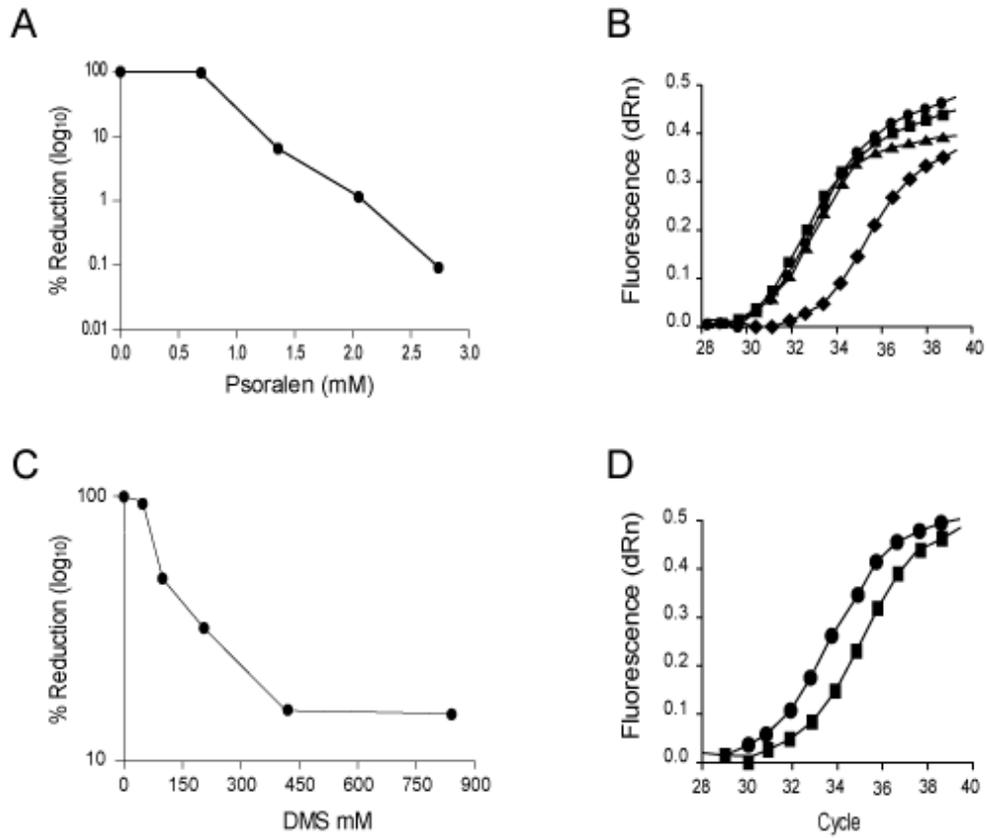


Figure 3.6

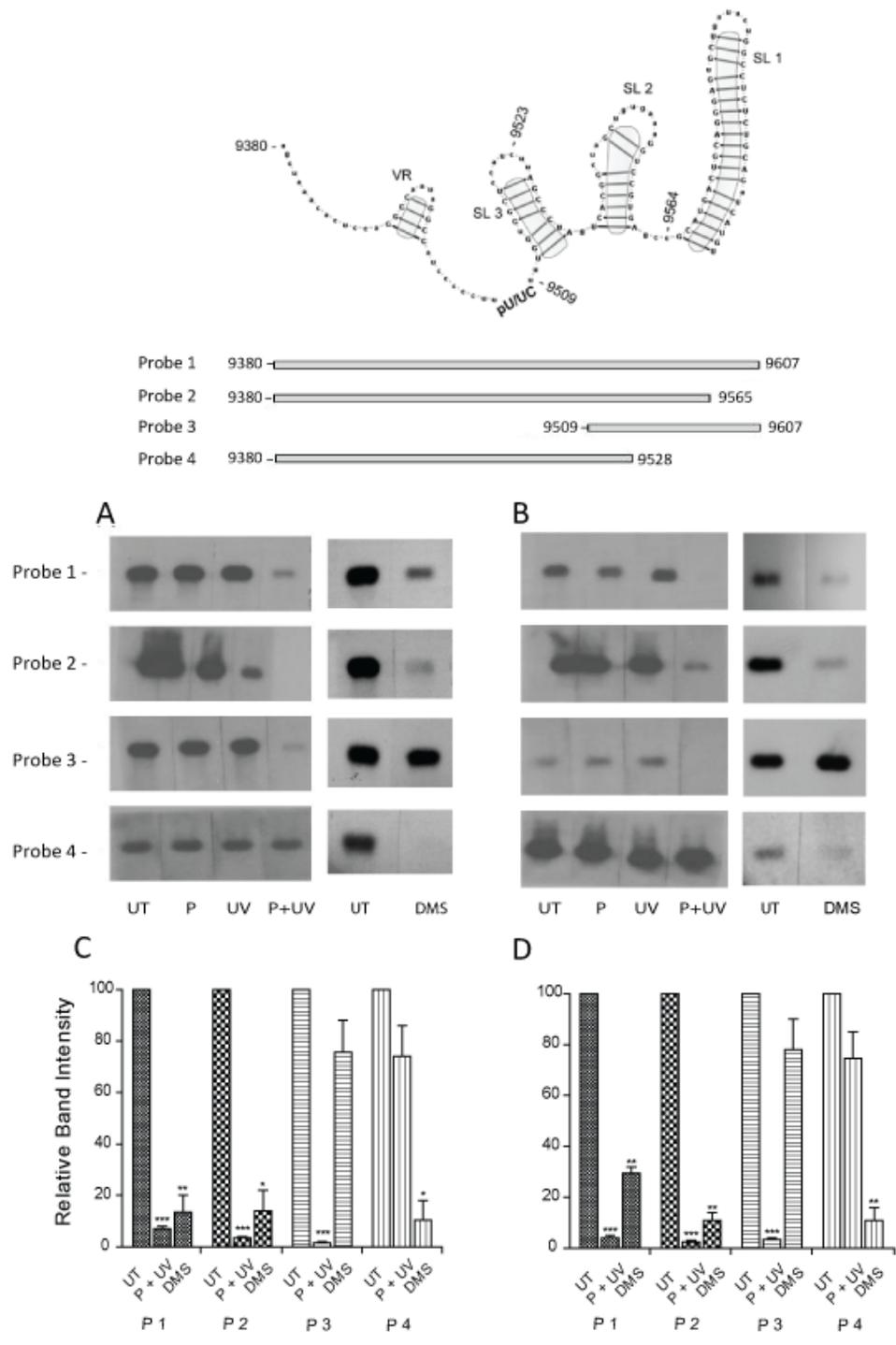


Figure 3.7

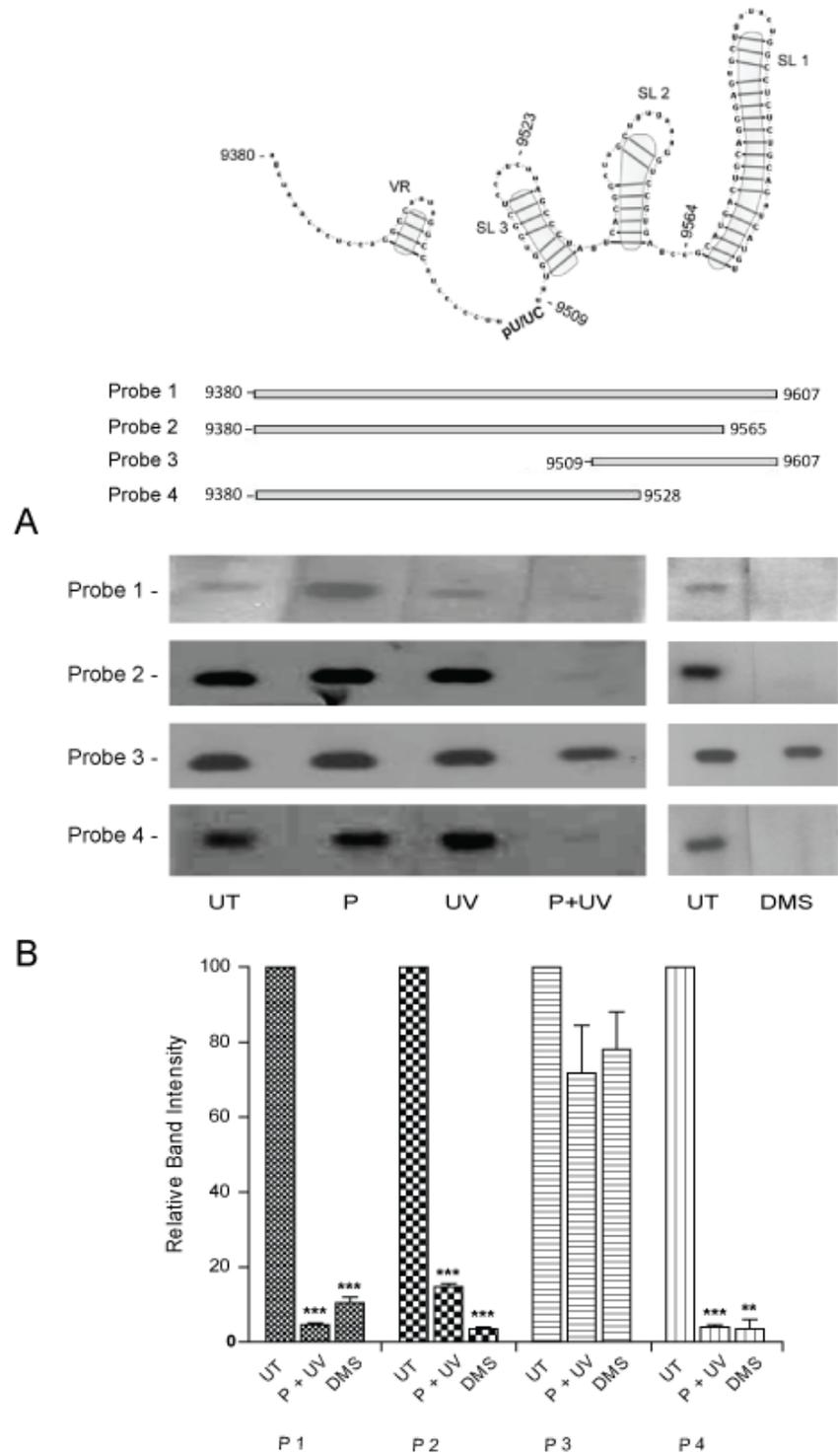
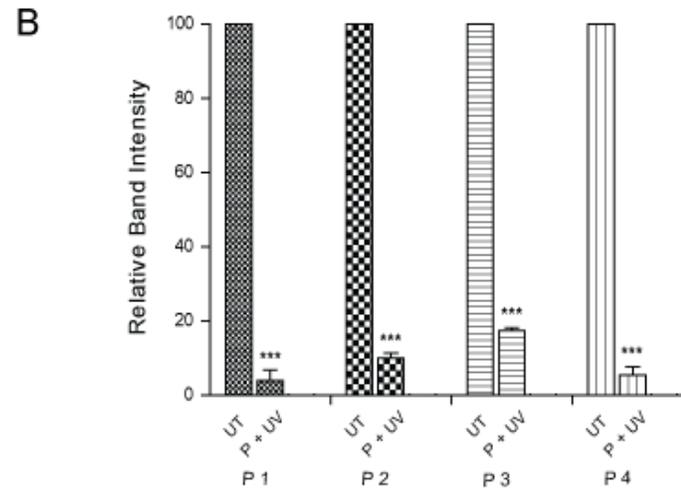
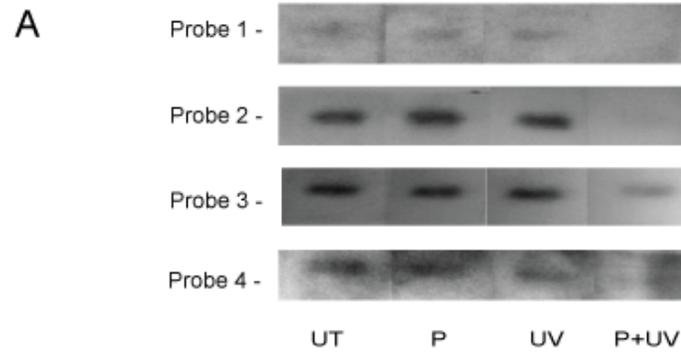
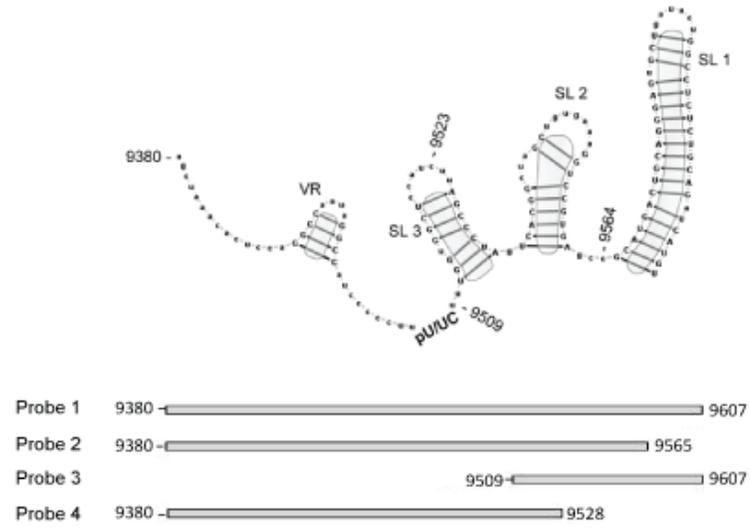


Figure 3.8



TRANSITION

Les résultats obtenus dans ce premier article nous fournissent pour la première fois, des preuves physiques de l'existence *in situ* d'éléments ARN simple et double brin dans le 3'UTR(+) du génome du VHC. Les éléments structurels que nous avons observés dans la région poly(U/UC) nous ont interpellés. En effet, les expériences réalisées avec le fragment subgénomique nous montrent que le domaine poly(U/UC) est constitué par un ARN simple brin. Or, dans le contexte de génome entier cette région présente une région à ARN double brin. Ceci suggère l'existence d'une interaction ARN-ARN distale entre le poly(U/UC) et une séquence présente en dehors du 3'UTR(+).

Quelques études rapportent l'importance dans le cycle viral de ces interactions distales dans les génomes viraux [382, 402, 405]. Dans le génome du VHC, les extrémités 5' et 3' possèdent des éléments structurels qui sont impliqués à la fois dans la régulation de la traduction et de la réplication de l'ARN viral [351, 385]. Ceci suggère qu'il existe une interaction, peut être de nature ARN-ARN, entre le 5' et le 3' du génome du VHC qui modulerait ces deux processus. Il a été montré qu'une interaction distale de ce type affecte la traduction virale [381, 382].

Dans l'article qui suit, j'ai caractérisé l'existence d'une interaction distale ARN-ARN entre les deux extrémités (5' et 3') du génome du VHC et démontré qu'elle a un rôle dans le cycle viral du VHC, notamment dans la réplication de l'ARN viral.

Chapitre 4 : Article 2

**LONG-RANGE INTERACTION INVOLVING DOMAIN II OF THE
5'UNTRANSLATED REGION AND THE VIRAL POLYMERASE
CODING SEQUENCE IS NECESSARY FOR EFFICIENT HEPATITIS
C VIRUS RNA REPLICATION.**

Elodie Rance^{1,2}, Jerome E. Tanner¹, and Caroline Alfieri^{1,2*}

¹Laboratory of Viral Pathogenesis, Research Center, Sainte-Justine University Hospital, Montreal, QC, Canada; and ²Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

Keywords: hepatitis C virus, 5'UTR, NS5B coding sequence, long range RNA-RNA interaction, genome circularization, viral replication.

[**Status:** in preparation for submission to the Journal of Virology].

SUMMARY

The 5' and 3' untranslated regions (UTR) of the hepatitis C virus (HCV) RNA genome contain structured elements which play important regulatory roles during translation and replication. Structural elements involved in both of these processes partially overlap; however the events inducing the switch from translation to replication are still unknown. The data presented here provide evidence for the existence and function of a long range RNA-RNA interaction between two distally located elements of the HCV genome. Using RNA binding assays, we showed that domain II of the 5'UTR (nt 95-110) and the NS5B (nt 8528-8543) coding sequence form a high-affinity RNA-RNA complex *in vitro*. This duplex is composed of Wobble and Watson-Crick base pairings, but only the latter is necessary and sufficient for the interaction. In order to investigate the functional role of this long range RNA-RNA interaction, the sequences were mutated either separately, to abolish the interaction affinity or, simultaneously, to restore complementarity, in the context of the full-length HCV genome. After transfection of HCV RNAs carrying mutations either in the 5'UTR or in the NS5B coding sequence, HCV RNA levels and virus titer were shown to decrease compared with wild-type. However, after transfecting RNAs containing the compensatory mutations, the quantity of intracellular HCV RNA and production of infectious virus were restored to levels similar to wild-type. Notably, the loss of affinity between these two sequences did not disrupt HCV translation. Since the RNA-RNA interaction between domain II of the 5'UTR and nt 8528-8543 of the NS5B coding sequence is required for efficient viral replication, we conclude that this conformation of HCV RNA is necessary for viral replication and may have a role in the regulatory switch between translation and replication.

INTRODUCTION

The hepatitis C virus (HCV) is a member of the *Flaviviridae*. Its genome consists of a 9.6 kb single-stranded RNA with positive polarity (12), containing one open reading frame (ORF) flanked by 5' and 3' untranslated regions (UTR) (44). The positive-strand HCV RNA genome serves as a template for two key steps in the viral life cycle, namely translation of proteins and RNA synthesis.

As with other RNA viral genomes, HCV RNA contains a number of RNA motifs which are thought to regulate processes of its life cycle, particularly with regard to translation and RNA replication. RNA structures in the untranslated regions (5'UTR and 3'UTR) were the first elements identified. The 5'UTR is a highly structured and conserved region (8, 9) containing the IRES element in domains II-IV (39), which is critical for the initiation of cap-independent translation (26, 27, 64). In addition, domains I and II are involved in the synthesis of HCV RNA, therefore domain II is thought to have a role in both replication and translation (19, 35, 40). The 3'UTR is a tripartite RNA structure containing a highly conserved sequence called the X-tail (7, 29, 37, 53). This region is critical for RNA replication (11, 17, 38, 66, 67), and evidence suggests that it also modulates HCV translation (10, 50). Other structural elements found in the coding sequence can influence the viral cycle as cis-signals. Specifically, RNA secondary structures in the Core coding sequence (25, 58) located at the 5' end of the HCV genome have been shown to be important for modulation of HCV translation and replication (36, 42, 60). At the 3' end, the NS5B coding sequence was predicted to form RNA structures (25, 58). One of these, the 5BSL3.2 stem loop, has been shown to be required for viral replication (18, 68) and was also reported to play a role in HCV translation via a distal interaction (45). Thus, there is considerable evidence indicating that the 5' and 3' ends of the

HCV genome contain structural elements which are involved in the regulation of both translation and RNA replication (10, 19). This points to the potential for cross-talk, perhaps involving actual physical interaction as might occur through the process of circularization, between the 5' and 3' ends of the HCV genome to modulate these two processes.

The circularization of RNA has a very important role in basic biological processes. In eukaryotic cells, for example, mRNA adopts this conformation to stimulate protein synthesis (20, 32, 54, 55). Genome circularization is also a common feature of many positive-strand RNA viruses (22, 23) and may have a role in different stages of their life cycle (3, 4, 16, 45). The mechanism of genome circularization can differ among virus families. In the poliovirus, circularization involves ribonucleoprotein complexes (23), whereas flavivirus genomes seem capable of forming long-range RNA-RNA interactions in a protein-independent manner (22, 34, 62). Circularization of the HCV genome was first thought to be mediated by cellular protein (30, 65, 66). Recent evidence, however, suggests the existence of a long-range RNA-RNA interaction between the 5'UTR and NS5B coding sequence, which affects HCV translation (45, 46). Moreover, bioinformatics analysis has predicted other long-range interactions in the HCV genome (56). Given this evidence, our aim was to provide biological proof for the existence of other long-range interactions in the HCV genome. We hypothesized that the circular conformation of the HCV genome, formed through distal RNA-RNA interactions, may have a role in modulating key events in the HCV life cycle including replication.

In this paper we present evidence for the existence of a new RNA-RNA distal interaction, involving domain II of the 5'UTR and nt 8528-8543 of the NS5B coding sequence. Further, mutations in this base pairing region prove, for the first time in the full length HCV genome, that RNA-RNA association between the ends of the HCV genome affects RNA

replication. Also this is the first study to report the involvement of the NS5B nt 8528-8543 sequence in the HCV life cycle.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture System.

The human hepatoma cell line Huh-7, kindly provided by Dr Tatsuo Takahashi (Health Science Research Resources Bank, Japan), was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, under 5% CO₂ conditions.

Construction of HCV Plasmids.

HCV 1b genomic RNA (ER-1b) was generated from the HCV RNA expression plasmid (p)ER-1b. The latter was derived from the pGEM-7Zf-HCV 1b template (52) with addition of the microRNA-122 complementary sequence (31) and the HCV 1b 3'-UTR (derived from HCV 1b RNA, kindly provided by Dr H. Soudeyns, CHU Ste-Justine). Changes were also introduced into the vector's T7 RNA polymerase promoter GAATACAAGCTTGTAATACGACTCACTATAGCCAGCCCC such that RNA transcription could begin at the predicted terminal guanine (underlined) nucleotide in the HCV genome. Plasmids (p)ER-1b mutated in the 5'UTR (nt 95-110) and/or the NS5B (nt 8528-8543) coding sequence were generated as follows. The 5' end mutants of the HCV genome spanning nucleotides 1-849 were obtained by three successive amplifications. The first PCR reaction was

performed by amplification of plasmid (p)ER-1b with primer “hindIII-T7HCV(1-19)-Sens” and two different antisense primers, namely “HCV-5UTR(77-110)BigMut-ASens” or “HCV-5UTR(77-110)SmallMut-ASens”. For the second PCR reaction, (p)ER-1b was amplified using primers “HCV-5UTR(111-130)-linkerSens” and “HCV(825-849)-ASens”. The third amplification was performed on the ligation product of the first two amplicons with primers “hindIII-T7HCV(1-19)-Sens” and “HCV(825-849)-ASens”. The amplification product was subsequently cloned in the *HindIII* and *ClaI* restriction sites of (p)ER-1b to yield the plasmids (p)ER-1B-5'UTR_{BigMut} and (p)ER-1B-5'UTR_{SmallMut}. In the same way, the NS5B mutants of the HCV genome spanning nucleotides 8060-9066 were obtained by three successive amplifications. The first two PCR reactions were performed using the plasmid (p)ER-1b. For the first reaction, primer “HCV-NS5B(8060-8084)-Sens” was used along with two different anti-sense primers, namely “HCV-NS5B(8511-8546)BigMut-ASens” or “HCV-NS5B(8511-8546)SmallMut-ASens”. For the second PCR reaction, primers used were “HCV-NS5B(8547-8576)-linkerSens” and “HCV-NS5B(9043-9066)-ASens”. The third amplification was performed on the ligation product of the first two amplicons with primers “HCV-NS5B(8060-8084)-Sens” and “HCV-NS5B(9043-9066)-ASens”. The amplification product was subsequently cloned in two *BglII* restriction sites of (p)ER-1b to yield the plasmids (p)ER-1B-NS5B_{BigMut} and (p)ER-1B-NS5B_{SmallMut}. We also generated the two double mutants (p)ER-1B-Dbl_{BigMut} and (p)ER-1B-Dbl_{SmallMut} which are mutated in both the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎ and NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ sequences. The 5'UTR_{(95-110)SmallMut} sequence is the reverse complement of NS5B_{(8528-8543)SmallMut}, while the 5'UTR_{(95-110)BigMut} sequence is the reverse complement of NS5B_{(8528-8543)BigMut}. The predicted DNA sequence of (p)ER-1b and (p)ER-1b_{mutant} plasmids was verified by DNA sequencing. The mutated sequences and the primer sequences are shown in (Tableau 4.I).

HCV RNA Expression Plasmids and Transfection.

Genomic-length HCV RNA (HCV_{WT}, HCV_{mutants}) was synthesized using the MEGAscript T7 kit (Ambion- Applied Biosystems, Austin, TX) and 1 µg of *Xba*I-linearized mung bean nuclease-treated (p)ER-1b, (p)ER-1b_{mutants} DNA (63). RNA transcription reactions proceeded for 4 to 6 h at 37°C, followed by DNA template removal using RNase-free DNase (Ambion Inc.), organic extraction and ethanol precipitation. Genomic RNAs were verified for predicted sizes and product integrity by resolution in a 0.8% formaldehyde-agarose gel.

Synthesized HCV RNAs (5 µg) were used for electroporation. Huh-7 cells were trypsinized, washed and resuspended at 5×10^6 cells/ml in PBS. RNA was mixed with 500 µl of cell suspension into a 1.5 ml tube and placed on ice for 10 min. The mixture was then transferred into an electroporation cuvette (Gene Pulser® cuvette 0.4 cm electrode gap, Bio-Rad), and pulsed at 270 V and 950 µF using the Gene Pulser™ (Bio-Rad). The cuvette was placed on ice for 5 min and the transfected cells were transferred into one well of a 6-well plate, containing 2 ml of culture medium.

HCV Genotype 1b (ER-1b): Cell Culture System.

A HCV 1b cell culture system, referred to as pER-1b, was developed in our laboratory. Successful electroporation of the HCV genome was verified by detection of HCV antigen-positive Huh-7 cells by fluorescence microscopy at 48 h post-electroporation (figure 4.1A). ER-1b virus secreted in the supernatant was assayed over a 15-day time course. HCV RNA was extracted in culture supernatants using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Toronto, Ontario, CANADA) before quantification by RT-qPCR (figure 4.1B). Infection of fresh Huh-7 hepatoma cells with secreted virus revealed the presence of HCV ER-1b RNA in cells by reverse transcriptase (RT)-PCR. At 24 h post-infection, total cellular RNA was

extracted with TriReagent® (Molecular Research Center, Inc.). RT-PCR was realized using the HCV sense primer 5'-GGTCGCGTAATTTGGGTAAGGTCA-3' (nt 685-710) and antisense primer 5'-TGGAGCAGTCGTTTCGTGACATGAT-3' (nt 943-966) (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) (figure 4.1C). Further, detection of both core and NS5B antigens in Huh-7 cells was observed 2 days post-infection by immunofluorescence (figure 4.1D).

Viral Translation, Level of HCV RNA in Cells and Virus Production by Mutants within the Long-Range Interaction Sequences.

Plasmids (p)ER-1b_{WT} and (p)ER-1b_{mutants} were digested with *Xba*I and treated with mung bean nuclease (New England Biolabs). HCV RNA was synthesized *in vitro* using the MEGAscript™ T7 kit (Ambion) as described above. First, viral translation was verified. HCV_{WT} and HCV_{mutants} genomes were electroporated in Huh-7 cells and, 24 h later, NS5B antigen expression was measured by immunofluorescence. The level of intracellular HCV RNA was then examined. Two days post-electroporation, total cellular RNA was extracted with TriReagent® (Molecular Research Center Inc.) and the quantity of HCV RNA was measured by RT-qPCR. Lastly, HCV virus production was quantified. Two days post-transfection, supernatant was collected. Cells were seeded 24 h before infection at a density of 3×10^5 cells/well in a 96-well plate. Huh-7 cells were inoculated with serial 10-fold dilutions of culture medium containing virus. One day post-infection total cellular RNA was extracted with TriReagent® (Molecular Research Center, Inc.) and HCV RNA was quantified by RT-qPCR. Two days post-infection, cells were fixed and subsequently stained using anti-NS5B antibodies and ffu/ml was measured (33).

HCV Immunofluorescence.

HCV core and NS5B expression were measured by immunofluorescence. Briefly, transfected Huh-7 or HCV infected cells were fixed in methanol, and HCV core and NS5B antigens were detected using anti-core monoclonal antibody 11-B3 and anti-NS5B monoclonal antibody 1826 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA). Bound monoclonal antibodies were detected following incubation with biotin-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and dichlorotriazinyl amino fluorescein (DTAF)-conjugated streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Quantification of HCV RNA.

Quantification of RNA was performed by RT-qPCR using the HCV sense primer “HCV-5UTR(130-146)-Sens” (nt 130-146) and antisense primer “HCV-5UTR(272-290)-Asens” (nt 272-290) (Integrated DNA Technologies) (Tableau 4.I) in conjunction with the QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen). Primers were used at final concentrations of 400 nM. HCV cDNA was amplified and quantified using the Mx3000P real-time PCR thermocycler (Stratagene Inc.) for 40 cycles, each consisting of a 15-second incubation at 94°C, followed by a 30-second annealing and elongation step at 72°C. Serial concentrations of synthetic HCV RNA (ER-1b) ranging from 1 pg to 100 ng served as HCV PCR template reference standards. Cellular HCV RNA concentrations were normalized with total RNA.

HCV Truncated RNA Expression and Binding Assays.

DNAs encoding the truncated forms of the 5'UTR and NS5B sequences of the HCV genome were generated by amplification as follows. Plasmid (p)ER-1b_{WT} or (p)ER-1b_{mutants} were used as templates for amplification with primers “HindIII-T7-HCV(1-19)-Sens” and

“HCV-5UTR(272-290)-Asens” to yield 5'UTR_{(1-290)WT}, 5'UTR_{(1-290)BigMut} and 5'UTR_{(1-290)SmallMut} PCR products. The primers “HCV-NS5B(8374-8392)-Sens” and “HCV-NS5B(8657-8676)-Asens” were used to produce NS5B_{(8374-8676)WT}, NS5B_{(8374-8676)BigMut} and NS5B_{(8374-8676)SmallMut} amplicons. PCR products were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel and purified using the QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Toronto, Ontario, CANADA). Truncated HCV RNAs were synthesized *in vitro* using a MEGAscript™ T7 kit (Ambion) as described above. When needed, RNA transcripts were labeled uniformly with [α -³²P] UTP [25 μ Ci, 800 Ci/mmol] and unincorporated isotope was eliminated using RNA Cleanup of RNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc.).

For RNA–RNA interactions, ³²P labeled transcripts were mixed with the indicated unlabeled RNAs, denatured as above in 50 mM sodium cacodylate (pH 7.5), 300 mM KCl and 1 mM MgCl₂ (15). The mixture was incubated at 95°C for 3 min, followed by slow cooling from 70°C to 37°C (1°C/min). RNA–RNA complexes were allowed to form for 30 min at 37°C and immediately analyzed by electrophoresis in 5% native polyacrylamide gels supplemented with 2.5 mM MgCl₂ (14). Electrophoresis was performed at 4°C for 1 h at 120 V in TBM buffer [45 mM Tris/HCl (pH 8.3), 43 mM boric acid, 0.1 mM MgCl₂]. In all cases, dried gels were analysed by autoradiography. The band intensity was measured using MacBiophotonics ImageJ software (Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). K_d and B_{max} values were calculated using the nonlinear regression analysis of GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) according to the equation $Y = B_{max} * X / (K_d + X)$, where X is the concentration of unlabelled RNA, K_d is the dissociation constant, Y is the percentage of bound probe, and B_{max} is the amplitude of the reaction representing maximal binding.

In Silico Predictions of RNA Structure and RNA-RNA Interaction.

The NS5B (nt 8490-8560) coding sequence structure was predicted using the RNA m-fold program (41, 70) located on the <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form2.3> server. RNAcofold (6) and RNAup (43) softwares were employed to predict the interaction between the 5'UTR and the NS5B coding sequence using Vienna RNA WebServers <http://rna.tbi.univie.ac.at/>

Conservation of Long-Range Interaction Sequences for All HCV Genotypes.

The “QuickAlign” tool of the HCV sequence database (http://hcv.lanl.gov/content/sequence/QUICK_ALIGN/QuickAlign.html) was used to realize multiple sequence alignments within the 5'UTR nt (95-110) and NS5B nt (8528-8543) long-range interaction region of HCV subtype reference sequences. The average identity match was calculated with ALISTAT software (http://caps.ncbs.res.in/iws/alistat_ali.html).

Data Analysis.

Data are expressed as the mean \pm SEM. The Student's t-test using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) was used for comparison of results from experiments with mutants and WT virus. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

RESULTS

The 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ RNAs Interact in a Dose-Dependent Manner.

Thurner et al. (2004) used bioinformatics modeling to predict the existence of various long-range RNA-RNA interactions in the HCV genome. One of these long-range interactions involves the 5'UTR and the NS5B coding sequences. We specifically examined the interaction generated by the coupling of 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ sequences (larger than that predicted by Thurner's study) by generating mutants in one or both regions in order to determine whether these two end regions of the HCV genome actually associate biologically and, if so, to attach a functional relevance to this association.

To investigate the possibility that the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and the NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ coding sequences of the HCV genome could interact, we analyzed whether *in vitro* 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ transcribed RNAs were able to form an RNA-RNA complex. 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ RNA is a transcribed RNA molecule (nt 1 to 290) containing domains I to III of the HCV 5'UTR which form stem-loop structures (39). The NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ (nt 8374 to 8676) has, to our knowledge, never been studied either *in vitro* or *in vivo* (figure 4.5). Our strategy involved the use of binding assays to determine the existence of an RNA-RNA complex between these two 300-base RNA sequences. To assess complex formation, an increased amount of the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ transcript was incubated with a molar excess of ³²P internally-labeled NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ RNA in low magnesium concentration and the product was resolved by polyacrylamide gel electrophoresis. Results indicate that an RNA-RNA complex was formed, as evidenced by the observation that an increase of unlabeled RNA yielded increased band intensity of the RNA-RNA complex (figure 4.2A). The data, therefore, point to the existence of an interaction between the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and the NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ HCV RNAs. The dissociation constant K_d was

obtained using a non linear regression equation and data from three independent experiments. The 5'UTR molecule bound with high affinity (K_d value = 70.67 nM and B_{max} = 85.15 %) (figure 4.2A, Tableau 4.II). The inverse experiment was also performed, in which transcribed 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ was ³²P-labeled and combined with an increased concentration of NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎. The data indicates a K_d of 83.93 nM and is consistent with RNA-RNA complex formation in a dose-dependent manner (figure 4.2A, figure 4.S1C).

In order to examine the folding and spatial alignment of the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ molecules, thus predicting existence of an interaction, two folding softwares were used, namely RNA_{up} (43) and RNA_{cofold} (6). These folding softwares are designed to predict optimal dimer formation with minimal free energy. Both softwares propose a model in which the 5'UTR and NS5B sequences form a duplex interaction between nt 95–110 of the 5'UTR and nt 8528–8543 of the NS5B coding sequence (RNA_{up} ΔG =-19,31 and RNA_{cofold} ΔG =-21,93) (figure 4.2B). The interaction is composed of a wobble base pairing generally present in RNA structures and a strict Watson-Crick base pairing (eight bases). Notably, the base pairing involved domain II of the 5'UTR.

In summary, these results are consistent with the presence of an interaction between the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ sequences of the HCV genome. *In vitro* this RNA-RNA complex forms in a dose-dependent manner at low magnesium concentration and without addition of proteins. Finally, using bioinformatics modeling tools, we showed that the nucleotides predicted to be involved in this interaction are nt 95–110 of the 5'UTR and nt 8528–8543 of the NS5B coding sequence, which concord with the predictions of Thurner et al. (56).

The Watson-Crick Base Pairing Sequence Is Necessary and Sufficient for the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎-NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ Interaction in the HCV Genome.

In vitro experiments demonstrated the existence of an interaction between the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and the NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ sequences in the HCV genome and bioinformatics tools predicted which sequences could be involved. We wanted to further investigate the requirement of nucleotides within the predicted duplex interaction (described in figure 4.2B). Four molecules mutated in the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎WT and the NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎WT sequences were constructed. Two RNA molecules, designated as 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎BigMut and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎BigMut, were mutated in sequences (five or six nucleotides, Tableau 4.I) involved in the entire duplex interaction (wobble and Watson-Crick base pairings). Two other molecules, designated as 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎SmallMut and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎SmallMut, were mutated only in sequences (two nucleotides, Tableau 4.I) involved in Watson-Crick base pairing. The 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎SmallMut and the NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎SmallMut are compensatory mutated sequences as are the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎BigMut and the NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎BigMut (figure 4.3A and Tableau 4.I).

NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎WT RNA was challenged with increasing concentrations of 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎mutants transcripts (5'UTR₍₁₋₂₉₀₎BigMut or 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎SmallMut) in order to test their capacity for interaction. The 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎BigMut and 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎SmallMut molecules were able to form RNA-RNA complexes with the NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎WT (figure 4.3B). However, parameters of non linear equations obtained with data from three independent experiments differed compared to interactions observed using all WT sequences. The 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎BigMut and 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎SmallMut RNAs bound to NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎WT with respective K_d values of 364,5 nM and 314,5 nM (figure 4.3C, Tableau 4.II). These dissociation constants were approximately four to five times greater compared with those obtained in experiments using 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎WT versus NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎WT. The inverse experiment in which the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎WT ³²P probe RNA was challenged with

NS5B_{(8374-8676)BigMut} or with NS5B_{(8374-8676)SmallMut} molecules was also performed (figure 4.S1A and 1B) with results indicating higher K_d values compared to those obtained using 5'UTR_{(1-290)WT} versus NS5B_{(8374-8676)WT} (figure 4.S1C). Notably, B_{max} values were shown to be smaller (Tableau 4.II) indicating a decrease in the percentage of retarded probes as well as in the amplitude of the reactions. Further, two more experiments were performed in which NS5B_{(8374-8676)mutants} were challenged with increasing concentrations of 5'UTR_{(1-290)mutants}, specifically 5'UTR_{(1-290)BigMut} /NS5B_{(8374-8676)BigMut} and 5'UTR_{(1-290)SmallMut} /NS5B_{(8374-8676)SmallMut}. Results for these pairings indicate that the respective K_d values of 72.35 nM and 74.84 nM were close to those obtained for the WT experiments (figure 4.3 B and C, Tableau 4.II), suggesting that the compensatory mutations were able to rescue base pairing affinity.

These results demonstrate that mutations in one of the two sequences predicted to be involved in the interaction of 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ RNAs cause a loss of binding affinity. Moreover, binding assays realized with molecules containing compensatory mutations were able to reconstitute the interaction. This data constitutes biological evidence that sequences identified by bioinformatics (nt 95 to 110 for the 5'UTR and nt 8528 to 8543 for the NS5B) are actually involved in the interaction of the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ regions within the HCV genome. Also, because no difference was observed in binding parameters comparing sequences mutated in the entire duplex interaction (5'UTR_{(1-290)BigMut}, NS5B_{(8374-8676)BigMut}) and sequences mutated only in Watson-Crick base pairing (5'UTR_{(1-290)SmallMut}, NS5B_{(8374-8676)SmallMut}), it was deduced that only sequences involving the strict canonical Watson-Crick base pairing are necessary and sufficient for the distal RNA-RNA interaction of the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ sequences in the HCV genome.

Role of the Distal RNA-RNA Interaction between the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎ and NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ Sequences in the HCV Life Cycle.

In vitro we showed that the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎ and NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ HCV genome sequences can associate. Having demonstrated the biological existence of this long-range interaction, we then speculated on its possible function within the HCV life cycle. To test its involvement in replication, we used the HCV cell culture model ER-1b (figure 4.1). Six mutants within the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎ and/or NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ sequences were generated, such as to disrupt or reconstitute the complementarity between the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎ and NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ sequences. Four simple mutants disrupt the complementarity, two in the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎ ((p)ER-1B-5'UTR_{BigMut} and (p)ER-1B-5'UTR_{SmallMut}) and two in the NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ ((p)ER-1B-NS5B_{BigMut} and (p)ER-1B-NS5B_{SmallMut}). Two double mutants could restore the complementarity, namely (p)ER-1B-Dbl_{BigMut} and (p)ER-1B-Dbl_{SmallMut} (Tableau 4.I). The m-fold program (41, 70) was used to ensure that mutations in the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎ and NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ sequences did not alter the RNA structures. The amino acid sequences also indicated fidelity (data not shown).

Initially, we evaluated whether the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎-NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ interaction could affect viral translation. HCV_{WT} and HCV_{mutants} genomes were individually electroporated into Huh-7 cells. After 24 h, transfected cells were fixed and tested for expression of NS5B. All mutants showed expression of this protein. Thus, disruption of the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎-NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ interaction had no effect on HCV translation (figure 4.4A).

Then, we investigated the effect of the RNA-RNA interaction on another step of the HCV life cycle. At 48 h post-transfection, intracellular HCV genome levels were determined by RT-qPCR. The assay point was chosen at 48 h post-transfection because HCV RNA synthesis is thought to begin by this time (5). For all HCV simple mutants (HCV genomes containing 5'UTR_{BigMut}, 5'UTR_{SmallMut}, NS5B_{BigMut} and NS5B_{SmallMut}), the production of RNA copies was

approximately 1 log₁₀ less (five- to eight-fold less) than HCV_{WT} ($1.7 \times 10^6 \pm 3.5 \times 10^5$ SEM copies/ μ g RNA_{tot}) which is statistically significant at $p < 0.05$. However, levels of HCV RNA were similar (difference not statistically significant) for HCV_{WT} and HCV double mutants (HCV genomes with Db_{BigMut}, Db_{SmallMut}) which contain compensatory mutations (figure 4.4B). This evidence suggests that the long range 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎-NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ interaction can affect intracellular HCV RNA replication.

Lastly, virus production was assayed in order to determine whether the long-range interaction 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎-NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ within the HCV genome could also affect the generation of infectious viral particles. At 48 h post-electroporation, supernatant fluid was collected from HCV-transfected cells and used to infect fresh cells. At 24 h post-infection, levels of intracellular HCV RNA were measured by RT-qPCR and, at 48 h post-infection, cells were stained for NS5B to determine the FFU/ml (33). We used both of these methods to determine the HCV titer. The data indicates that HCV simple mutants produced approximately 1 log₁₀ less (4 to 10 times less) infectious virus than HCV_{WT} ($1.8 \times 10^4 \pm 3.8 \times 10^3$ SEM copies/ μ g RNA_{tot} and $6.9 \times 10^3 \pm 2.1 \times 10^3$ SEM FFU/ml), which is statistically significant ($p < 0.05$). However, the HCV double mutants produced infectious virus yields similar to HCV_{WT} (difference not statistically significant) (figure 4.4C). This indicates that the disruption of long-range interaction 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎-NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ also alters production of infectious HCV .

Taken together, these data constitute compelling evidence that the long range 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎-NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ interaction plays an important role in the viral cycle. Disruption of this RNA-RNA interaction was shown to down-regulate the level of intracellular HCV RNA by potentially acting on RNA synthesis or RNA stability, and negatively affecting virus production. These negative effects were reversed by restoration of complementarity in the base pairing. Finally, use of the four simple mutated constructs yielded data suggesting that

disruption of only Watson-Crick base pairing was sufficient to decrease HCV replication. The essential role of this long-range interaction is reinforced by the observation of sequence conservation within the interacting region among the different HCV genotypes. Average nucleic acid sequence identity was 90% for the 5'UTR region and 70% for the NS5B region (figure 4.5).

DISCUSSION

This paper provides biological evidence demonstrating the existence of a novel long range RNA-RNA interaction involving the 5'UTR (nt 95-110) and the NS5B (nt 8528-8543) sequences of the full-length HCV genome. In terms of functional importance, analysis of HCV mutant viruses indicates that this distal interaction is essential for HCV replication efficiency. The data strengthen the contention that contact between the 5' and 3' ends of the HCV genome exists biologically, that this interaction plays an important role in the viral cycle and that such long-range interactions could constitute a common feature in viral RNA genomes (23, 24, 28).

An *in vitro* RNA binding assay was used to study the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎-NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ interaction. Analysis of the RNA-RNA complex indicates that this interaction occurs with high affinity and in a dose-dependent manner. This complex is stable at low magnesium concentration and, importantly, does not require proteins *in vitro* (figure 4.2A). Bioinformatics modeling and mutational analyses provided evidence that the interaction between the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and the NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ molecules involved nt 95–110 of the 5'UTR and nt 8528–8543 of the NS5B coding sequence (figure 4.2B). Interestingly, we noted that this duplex is

composed of two types of base pairing, namely the canonical Watson-Crick and the wobble. Our results indicate that only the strict canonical Watson-Crick base pairing is necessary and sufficient for the distal RNA-RNA interaction (figure 4.3). The wobble base pair is found in RNA secondary structure and is used in different classes of RNA such as tRNA (59). This base pairing might be involved in stabilizing the duplex 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎-NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎.

Six HCV mutant genomes were generated to examine the role of the long range RNA-RNA interaction (5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎-NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎) on the HCV life cycle. For all mutants, the 5'UTR structures were shown to be preserved (m-fold software, data not shown) and the amino acid sequences were not altered. To construct the mutants we used a full length HCV 1b genome (ER-1b) replication system developed in our laboratory. This system can replicate HCV RNA and produce infectious virus in Huh-7 cells (figure 4.1).

Mutations in either the 5'UTR or the NS5B sequences did not interfere with viral translation. Using the immunofluorescence assay targeting the NS5B protein we showed efficient expression at 24 h post-transfection (figure 4.4A). We also demonstrated that mutations within the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎ or the NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ sequences induced a decrease in intracellular HCV RNA (figure 4.4B) and in HCV titer (figure 4.4C) at 48 h post-transfection. Importantly, mutations in the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎ and in the NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ sequences that restore complementarity were able to rescue levels of intracellular HCV RNA as well as the production of infectious virus (figure 4.4B and 4C). Taken together, the data indicate that this distal RNA-RNA interaction plays an important role in the HCV life cycle. The level of intracellular HCV RNA is reduced when the interaction is destabilized, indicating that this long-range base pairing is important for HCV RNA synthesis. These observations corroborate earlier results reported for Dengue virus, also a member of the *Flaviviridae*. Indeed, Alvarez et al. have shown that two sets (5'-3' CS and 5'-3' UAR) of complementary sequences located at the distal

ends of the Dengue virus genome were able to interact and affect genome amplification *in vivo* (3, 4). However we cannot exclude the possibility that the conformation of the HCV genome induced by this RNA-RNA interaction might also stabilize viral RNA, as suggested by Villordo et al. for the Dengue virus system (61). Obliteration of base-pairing affinity between the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎ and NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ also affects production of infectious virus, which may be a direct result of the reduction in HCV RNA or a consequence of the loss of the RNA packaging signal for HCV RNA (13).

To our knowledge, this is the first paper to report that a long-range interaction can influence HCV RNA replication. This interaction involves a sequence of the NS5B coding region located upstream of sequences already studied. It was documented previously that the 3' end of the NS5B region affects both viral translation (45) and RNA replication (18) by RNA-RNA binding involving the 5BSL3.2 stem loop. The only data available for the 5' end of this sequence had been obtained by predictive analysis (56). Here, we report results obtained on the biological characterization of a novel sequence located in the NS5B coding region (nt 8528-8543) and its influence on HCV replication through distal RNA-RNA interaction (figure 4.5). The distal sequence involved in the interaction is stem loop II (or domain II) of the 5'UTR. This domain forms part of the IRES element and is known to be important for HCV translation (39). It was also demonstrated that this region is necessary for RNA replication (35) (65), suggesting that domain II of the 5'UTR participates in both replication and translation. Our targeted region also incorporates domain II of the 5'UTR, hence reinforcing the claim that domain II of the 5'UTR has an important role in HCV replication. Our work further extends these observations by providing mechanistic relevance implicating these regions in the formation of a long-range interaction, namely 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎-NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎.

Through *in vitro* binding studies, we observed an RNA-RNA interaction in the absence of protein. However, in the *in vivo* setting, viral and cellular proteins bind to the 5' and 3' ends of HCV genome and could modulate or stabilize this interaction. It has been proposed that the viral protein NS5B is involved in genome circularization (69), and prior studies suggest that certain cellular proteins, including PTB (1, 57), PBCP2 (65) and La (2, 51), bind to both 5' and 3' ends of the HCV genome. Our experiments using a series of mutants to break and then restore binding affinity were designed to discount any involvement of proteins in the long-range RNA-RNA interaction.

The circular conformation could be an advantage for viral translation (45), RNA synthesis, viral RNA stability or HCV persistence. Certain viruses can persist in the host because they have the capacity to overcome or circumvent immune responses. There is a putative association between persistent viruses and the presence of RNA tertiary structures (49). High ordered RNA structures, which include circular forms, could potentially induce evasion from cell defense mechanisms and, more particularly, escape from innate attack by mimicking structured cellular RNAs such as tRNA. The conformation adopted would not be recognized by dsRNA binding proteins (like PKR) (47) which are coupled to antiviral pathways such as the interferon pathway (21).

HCV is classified into seven major genotypes (48). Using bioinformatics modeling tools, we have shown that the nucleic acid sequences involved in the long-range interaction are present in all HCV genotypes, with 90% identity for the 5'UTR and 70% for the NS5B sequences (figure 4.5). The existence of such sequence conservation among all HCV genotypes provides added evidence demonstrating the biological importance of this distal interaction.

In summary, this work uses binding studies to document the existence of an RNA-RNA interaction between domain II of the 5'UTR and nt 8528-8543 of the NS5B coding sequence.

In the full-length HCV genome, this long-range interaction was shown to promote viral RNA replication and virus production. Taken together, the data presented in this paper support the postulate that the HCV genome may adopt a circular conformation to modulate the viral replication cycle and, potentially, to induce a switch from translation to replication (figure 4.5).

ACKNOWLEDGEMENTS

ER is supported by doctoral studentships from the Department of Microbiology and Immunology (University of Montréal), and from the Faculty of Graduate Studies (University of Montréal). This work was funded in part by a grant from the Canadian Institutes for Health Research Proof-of-Principle initiative (grant number 82572).

REFERENCES

1. **Ali, N., and A. Siddiqui.** 1995. Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J Virol* **69**:6367-6375.
2. **Ali, N., and A. Siddiqui.** 1997. The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:2249-2254.
3. **Alvarez, D. E., C. V. Filomatori, and A. V. Gamarnik.** 2008. Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology* **375**:223-235.
4. **Alvarez, D. E., M. F. Lodeiro, S. J. Luduena, L. I. Pietrasanta, and A. V. Gamarnik.** 2005. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol* **79**:6631-6643.
5. **Bartenschlager, R., and S. Sparacio.** 2007. Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Res* **127**:195-207.
6. **Bernhart, S. H., H. Tafer, U. Muckstein, C. Flamm, P. F. Stadler, and I. L. Hofacker.** 2006. Partition function and base pairing probabilities of RNA heterodimers. *Algorithms Mol Biol* **1**:3.
7. **Blight, K. J., and C. M. Rice.** 1997. Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* **71**:7345-7352.

8. **Brown, E. A., H. Zhang, L. H. Ping, and S. M. Lemon.** 1992. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* **20**:5041-5045.
9. **Bukh, J., R. H. Purcell, and R. H. Miller.** 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:4942-4946.
10. **Bung, C., Z. Bochkaeva, I. Terenin, R. Zinovkin, I. N. Shatsky, and M. Niepmann.** 2010. Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Lett* **584**:837-842.
11. **Cheng, J. C., M. F. Chang, and S. C. Chang.** 1999. Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA. *J Virol* **73**:7044-7049.
12. **Choo, Q. L., K. H. Richman, J. H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, R. Medina-Selby, P. J. Barr, and et al.** 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2451-2455.
13. **Das, A. T., M. M. Vrolijk, A. Harwig, and B. Berkhout.** 2012. Opening of the TAR hairpin in the HIV-1 genome causes aberrant RNA dimerization and packaging. *Retrovirology* **9**:59.
14. **Fernandez-Miragall, O., R. Ramos, J. Ramajo, and E. Martinez-Salas.** 2006. Evidence of reciprocal tertiary interactions between conserved motifs involved in organizing RNA structure essential for internal initiation of translation. *Rna* **12**:223-234.
15. **Ferrandon, D., I. Koch, E. Westhof, and C. Nusslein-Volhard.** 1997. RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles. *Embo J* **16**:1751-1758.

16. **Filomatori, C. V., M. F. Lodeiro, D. E. Alvarez, M. M. Samsa, L. Pietrasanta, and A. V. Gamarnik.** 2006. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev* **20**:2238-2249.
17. **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. *J Virol* **76**:5326-5338.
18. **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. *J Virol* **79**:380-392.
19. **Friebe, P., V. Lohmann, N. Krieger, and R. Bartenschlager.** 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* **75**:12047-12057.
20. **Gallie, D. R.** 1991. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev* **5**:2108-2116.
21. **Goodbourn, S., L. Didcock, and R. E. Randall.** 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* **81**:2341-2364.
22. **Hahn, C. S., Y. S. Hahn, C. M. Rice, E. Lee, L. Dalgarno, E. G. Strauss, and J. H. Strauss.** 1987. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol* **198**:33-41.
23. **Herold, J., and R. Andino.** 2001. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* **7**:581-591.
24. **Hewlett, M. J., R. F. Pettersson, and D. Baltimore.** 1977. Circular forms of Uukuniemi virion RNA: an electron microscopic study. *J Virol* **21**:1085-1093.

25. **Hofacker, I. L., M. Fekete, C. Flamm, M. A. Huynen, S. Rauscher, P. E. Stolorz, and P. F. Stadler.** 1998. Automatic detection of conserved RNA structure elements in complete RNA virus genomes. *Nucleic Acids Res* **26**:3825-3836.
26. **Honda, M., M. R. Beard, L. H. Ping, and S. M. Lemon.** 1999. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* **73**:1165-1174.
27. **Honda, M., E. A. Brown, and S. M. Lemon.** 1996. Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *Rna* **2**:955-968.
28. **Hsu, M. T., J. D. Parvin, S. Gupta, M. Krystal, and P. Palese.** 1987. Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:8140-8144.
29. **Ito, T., and M. M. Lai.** 1997. Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *J Virol* **71**:8698-8706.
30. **Ito, T., S. M. Tahara, and M. M. Lai.** 1998. The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol* **72**:8789-8796.
31. **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.

32. **Kahvejian, A., Y. V. Svitkin, R. Sukarieh, M. N. M'Boutchou, and N. Sonenberg.** 2005. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* **19**:104-113.
33. **Kato, T., T. Date, A. Murayama, K. Morikawa, D. Akazawa, and T. Wakita.** 2006. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc* **1**:2334-2339.
34. **Khromykh, A. A., H. Meka, K. J. Guyatt, and E. G. Westaway.** 2001. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol* **75**:6719-6728.
35. **Kim, Y. K., C. S. Kim, S. H. Lee, and S. K. Jang.** 2002. Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* **290**:105-112.
36. **Kim, Y. K., S. H. Lee, C. S. Kim, S. K. Seol, and S. K. Jang.** 2003. Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *Rna* **9**:599-606.
37. **Kolykhalov, A. A., S. M. Feinstone, and C. M. Rice.** 1996. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* **70**:3363-3371.
38. **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. *J Virol* **74**:2046-2051.
39. **Lukavsky, P. J.** 2009. Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res* **139**:166-171.

40. **Luo, G., S. Xin, and Z. Cai.** 2003. Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **77**:3312-3318.
41. **Mathews, D. H., D. H. Turner, and M. Zuker.** 2007. RNA secondary structure prediction. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* **Chapter 11**:Unit 11 2.
42. **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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:2879-2884.
43. **Muckstein, U., H. Tafer, J. Hackermuller, S. H. Bernhart, P. F. Stadler, and I. L. Hofacker.** 2006. Thermodynamics of RNA-RNA binding. *Bioinformatics* **22**:1177-1182.
44. **Penin, F., J. Dubuisson, F. A. Rey, D. Moradpour, and J. M. Pawlotsky.** 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* **39**:5-19.
45. **Romero-Lopez, C., and A. Berzal-Herranz.** 2012. The functional RNA domain 5BSL3.2 within the NS5B coding sequence influences hepatitis C virus IRES-mediated translation. *Cell Mol Life Sci* **69**:103-113.
46. **Romero-Lopez, C., and A. Berzal-Herranz.** 2009. A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *Rna* **15**:1740-1752.
47. **Saunders, L. R., and G. N. Barber.** 2003. The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *Faseb J* **17**:961-983.
48. **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.
49. **Simmonds, P., A. Tuplin, and D. J. Evans.** 2004. Detection of genome-scale ordered RNA structure (GORS) in genomes of positive-stranded RNA viruses: Implications for virus evolution and host persistence. *Rna* **10**:1337-1351.
50. **Song, Y., P. Friebe, E. Tzima, C. Junemann, R. Bartenschlager, and M. Niepmann.** 2006. The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *J Virol* **80**:11579-11588.
51. **Spangberg, K., L. Goobar-Larsson, M. Wahren-Herlenius, and S. Schwartz.** 1999. The La protein from human liver cells interacts specifically with the U-rich region in the hepatitis C virus 3' untranslated region. *J Hum Virol* **2**:296-307.
52. **Takamizawa, A., C. Mori, I. Fuke, S. Manabe, S. Murakami, J. Fujita, E. Onishi, T. Andoh, I. Yoshida, and H. Okayama.** 1991. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* **65**:1105-1113.
53. **Tanaka, T., N. Kato, M. J. Cho, K. Sugiyama, and K. Shimotohno.** 1996. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* **70**:3307-3312.
54. **Tarun, S. Z., Jr., and A. B. Sachs.** 1996. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *Embo J* **15**:7168-7177.
55. **Tarun, S. Z., Jr., and A. B. Sachs.** 1995. A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev* **9**:2997-3007.
56. **Thurner, C., C. Witwer, I. L. Hofacker, and P. F. Stadler.** 2004. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J Gen Virol* **85**:1113-1124.
57. **Tsuchihara, K., T. Tanaka, M. Hijikata, S. Kuge, H. Toyoda, A. Nomoto, N. Yamamoto, and K. Shimotohno.** 1997. Specific interaction of polypyrimidine tract-

- binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X. *J Virol* **71**:6720-6726.
58. **Tuplin, A., J. Wood, D. J. Evans, A. H. Patel, and P. Simmonds.** 2002. Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus. *Rna* **8**:824-841.
59. **Varani, G., and W. H. McClain.** 2000. The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO Rep* **1**:18-23.
60. **Vassilaki, N., P. Friebe, P. Meuleman, S. Kallis, A. Kaul, G. Paranhos-Baccala, G. Leroux-Roels, P. Mavromara, and R. Bartenschlager.** 2008. Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J Virol* **82**:11503-11515.
61. **Villordo, S. M., D. E. Alvarez, and A. V. Gamarnik.** 2010. A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication. *Rna* **16**:2325-2335.
62. **Villordo, S. M., and A. V. Gamarnik.** 2009. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res* **139**:230-239.
63. **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. *Nat Med* **11**:791-796.
64. **Wang, C., P. Sarnow, and A. Siddiqui.** 1993. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* **67**:3338-3344.

65. **Wang, L., K. S. Jeng, and M. M. Lai.** 2011. 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* **85**:7954-7964.
66. **Yi, M., and S. M. Lemon.** 2003. 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **77**:3557-3568.
67. **Yi, M., and S. M. Lemon.** 2003. Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *Rna* **9**:331-345.
68. **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. *J Virol* **78**:1352-1366.
69. **Zhang, J., O. Yamada, T. Sakamoto, H. Yoshida, H. Araki, T. Murata, and K. Shimotohno.** 2005. Inhibition of hepatitis C virus replication by pol III-directed overexpression of RNA decoys corresponding to stem-loop structures in the NS5B coding region. *Virology* **342**:276-285.
70. **Zuker, M., and P. Stiegler.** 1981. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res* **9**:133-148.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 4.1. ER-1b: a HCV cell culture system.

This system was created in order to study the HCV-1b genome in infected cells. In this study it was used to characterize the influence of the interaction between the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and the NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ sequences on the HCV life cycle. Huh-7 cells were transfected with full length HCV RNA. (A) Expression of HCV core (top row) or NS5B (bottom row) proteins was measured at 2 days post mock-transfection of Huh-7 cells (UT, left column) or post-transfection of Huh-7 cells with HCV ER-1b RNA (ER-1b, right column). (B) For 15 days, levels of HCV RNA (ER-1b) in culture supernatants were quantified by RT-qPCR. Results are presented as the mean of two individual experiments \pm SEM. This is indicative of HCV RNA replication in transfected cells and production of virions. Fresh Huh-7 cells were then infected with supernatants produced by transfected Huh-7 cells. (C) HCV ER-1b RNA was detected by RT-PCR in infected Huh-7 cells. (D) Expression of HCV core (top row) or NS5B (bottom row) proteins was also observed in Huh-7 cells, at 2 days post mock-infection (UT, left column) or post-infection with HCV ER-1b (ER-1b, right column).

Figure 4.2. Interaction between the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ molecules is dependent on RNA concentration.

(A) 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ RNA was used as ³²P-labeled probe (20 nM) and incubated with increasing concentrations of unlabelled NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ RNA (0, 50, 100, 200, 400, 800 nM) in binding buffer and vice-versa. Complexes were separated on native 5% acrylamide gels with TBM. These experiments were repeated three times and the data used to draw non linear graphs and to

calculate the K_d value (probe vs challenge RNA). (B) The interaction between the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ sequences was predicted with RNAup (43) and RNAcofold (6) using Vienna RNA WebServers <http://rna.tbi.univie.ac.at/>. A duplex binding pattern is proposed, with boxed sequences adopting strict canonical Watson-Crick base pairing.

Figure 4.3. Determination of nucleotides necessary for the interaction between the 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and the NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ sequences.

(A) Representation of the interaction between the WT or mutated 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎ and the NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ sequences. The position of mutations is indicated by arrows, and mutated sequences are featured in Tableau 4.I (boxed sequences are in Watson-Crick base pairing). (B) The binding assays were performed with ³²P labeled probes NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎WT or NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎mutants RNAs and increasing concentrations of unlabeled 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎mutants transcripts (0, 50, 100, 200, 400, 1000 nM). (BigMut) refers to the reaction in which NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎WT (probe) is combined with 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎BigMut RNA mutated in the entire sequence involved in the duplex predicted in figure 4.2B, whereas (SmallMut) refers to the reaction with 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎SmallMut RNA mutated only in the sequence involved in strict Watson-Crick base pairing. Dbl_{mutants} (Dbl_{SmallMut} or Dbl_{BigMut}) refers to the binding between 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎mutant RNA and the ³²P labeled NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎mutant RNA containing complementary mutations (see Tableau 4.I). Dbl_{BigMut} is ³²P-labeled NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎BigMut versus 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎BigMut (0, 50, 100, 200,400 nM) and Dbl_{SmallMut} is ³²P-labeled NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎SmallMut versus 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎SmallMut (0, 50, 100, 200,400, 1000 nM). (C) These experiments were repeated three times and the data were used to draw non linear curves from which the K_d value was calculated. Three curves for Big Mutants: ³²P-labeled NS5B₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎WT vs 5'UTR₍₁₋₂₉₀₎WT (WT), (BigMut), (Dbl_{BigMut}) and three curves for Small Mutants: (WT), (SmallMut), (Dbl_{SmallMut}) are represented.

Figure 4.4. Role of the long-range interaction between the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎ and NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ sequences on the HCV life cycle.

HCV_{WT} (ER-1b) and HCV_{mutants} genomes of 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎-NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ base pairing were used to transfect Huh-7 cells. (A) Transfected Huh-7 cells express HCV antigens. Expression of NS5B protein was verified 1 day post mock-transfection of Huh-7 cells (UT) or of Huh-7 cells transfected with HCV_{WT} or HCV_{mutants} RNA (BigMut or SmallMut of HCV-5'UTR, HCV-NS5B or HCV-Dbl). (B) Level of intracellular HCV RNA is affected by mutation in the base pairing. Two days post-electroporation, intracellular HCV RNA was quantified by RT-qPCR. Results represent the mean of three individual experiments \pm SEM and P-values < 0.05 (*), < 0.01 (**) were determined by the Student's t-test. (C) Production of infectious virions is also affected: One day post-infection, intracellular HCV RNA was quantified by RT-qPCR. Results represent the mean of three individual experiments \pm SEM and P-values < 0.05 (*), < 0.01 (**) were determined by the Student's t-test. At two days post-infection, immunofluorescence against NS5B was realized to determine focus-forming units (FFU)/ml (33). Results represent the mean of three individual experiments \pm SEM and P-values < 0.05 (*), < 0.01 (**) were determined by the Student's t-test.

Figure 4.5. Circularization of the HCV genome induced by long-range interaction 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎-NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎.

The upper portion of the figure represents secondary structures within the 5'UTR and a part of the NS5B coding sequence of the HCV genome. The 5'UTR region is composed of four highly structured domains, and the NS5B (nt 8490-8560) coding sequence seems to contain a stem-loop structure (m-fold program (41, 70)). Residues boxed in the 5'UTR and the NS5B regions are minimum sequences involving in the 5'UTR₍₉₅₋₁₁₀₎-NS5B₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ interaction (center-left).

RNA sequence conservation for all HCV genotypes is shown (center right). The depiction (lower part of the figure) shows the long-range RNA-RNA interaction (LRI) leading to circularization of the viral genome.

Figure 4.S1. Inverse reactions of binding assays.

The binding assays were performed using ^{32}P -labeled $5'\text{UTR}_{(1-290)\text{WT}}$ RNA and increasing concentrations of unlabeled (A) $\text{NS5B}_{(8374-8676)\text{BigMut}}$ (0, 400, 800, 1000, 1600 nM) or (B) $\text{NS5B}_{(8374-8676)\text{SmallMut}}$ (0, 100, 200, 400, 800, 1000 nM) transcripts. Experiments were repeated three times and the data were used to calculate the K_d value from nonlinear curves, including the curve for reaction probe $5'\text{UTR}_{(1-290)\text{WT}}$ versus $\text{NS5B}_{(8374-8676)\text{WT}}$ (probe versus challenge RNA). (C) Table showing binding assay parameters (K_d and B_{max}).

FIGURES AND TABLES

Tableau 4.I

TABLE 1. Sequences used

Primers	5' – 3' sequence
hindIII-T7-HCV(1-19)-Sens	<u>AAGCTT</u> <u>GTAAATACGACTCACTATAGCCAGCCCCCGATTGGGGG</u>
HCV-5UTR(77-110)BigMut-ASens	CTGTACCACATTGGTCCTAACGCCATGGCTAGAC
HCV-5UTR(77-110)SmallMut-ASens	CTGTACCACACTCATACTAACGCCATGGCTAGAC
HCV-5UTR(111-130)-linkerSens	CCTCCAGGACCCCCCTCCC
HCV(825-849)-ASens	GCAGATTCCCTGTGCATAGTTCAC
HCV-NS5B(8060-8084)-Sens	TAAGCCAGCCCGCCTATCGTATTG
HCV-NS5B(8511-8546)BigMut-Asens	GTTGACCAACATGGTACAGTCCTGGAGCTTCGCAGC
HCV-NS5B(8511-8546)SmallMut-Asens	GTTGACGAGCATGGTACAGTCCTGGAGCTTCGCAGC
HCV-NS5B(8547-8576)-linkerSens	GGAGACGACCTCGTCGTTATCTGTGAAAGC
HCV-NS5B(9043-9066)-ASens	TGAGGCATGAAGCCACCCTATTGA
HCV-5UTR(130-146)-Sens	CGGGAGAGCCATAGTGG
HCV-5UTR(272-290)-Asens	AGTACCACAAGGCCTTCG
HCV-NS5B(8374-8392)-Sens	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CCTTTATATCGGGGGTCC
HCV-NS5B(8657-8676)-Asens	AGTCGTATTCTGGTTGGGGC
RNA Sequences of LRI	5' – 3' sequence
5'UTR ₍₉₅₋₁₁₀₎ WT	UAUGAGUGUCGUGCAG
5'UTR ₍₉₅₋₁₁₀₎ SmallMut	UAUGAGUGUG <u>GUAC</u> G
5'UTR ₍₉₅₋₁₁₀₎ BigMut	<u>GACCA</u> AUGUG <u>GUAC</u> G
NS5B ₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ WT	CUGCACGAUGCUCGUGA
NS5B ₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ SmallMut	CUG <u>UACCA</u> UGCUCGUGA
NS5B ₍₈₅₂₈₋₈₅₄₃₎ BigMut	CUG <u>UACCAUGU</u> GGUCA

The T7 promoter is underlined. HindIII site are noted in bold. Mutated nucleotides are noted in bold italic.

Tableau 4.II

TABLE 2. Binding variables of the 5'UTR–NS5B RNAs interaction

RNA probe	Unlabelled RNA	Kd (nM)	Bmax (%)
NS5B ₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ WT	5'UTR ₍₁₋₂₉₀₎ WT	70.67 ± 7.20	85.15 ± 2.25
	5'UTR ₍₁₋₂₉₀₎ BigMut	364.7 ± 124.6	49.78 ± 7.47
	5'UTR ₍₁₋₂₉₀₎ SmallMut	314.5 ± 120.8	49.64 ± 7.55
NS5B ₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ BigMut	5'UTR ₍₁₋₂₉₀₎ BigMut	74.84 ± 7.28	83.35 ± 2.15
NS5B ₍₈₃₇₄₋₈₆₇₆₎ SmallMut	5'UTR ₍₁₋₂₉₀₎ SmallMut	72.35 ± 8.04	67.45 ± 1.85

Values are the means of three independent assays ± SD. Kd is the dissociation constant and Bmax the amplitude of the binding reaction.

Figure 4.1

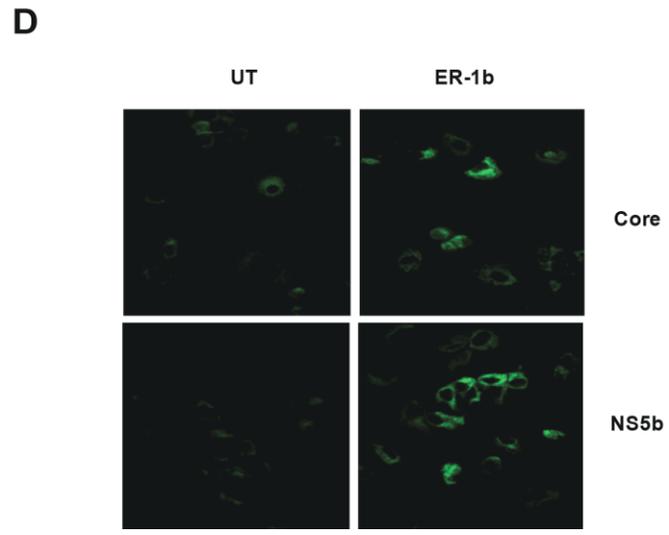
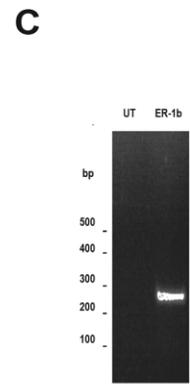
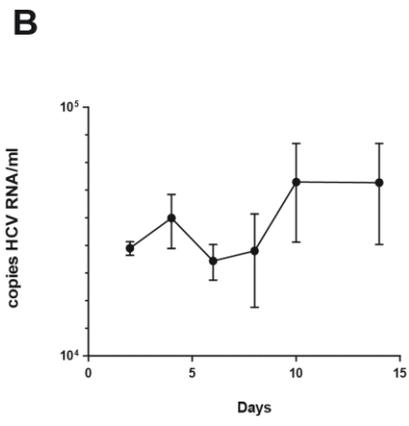
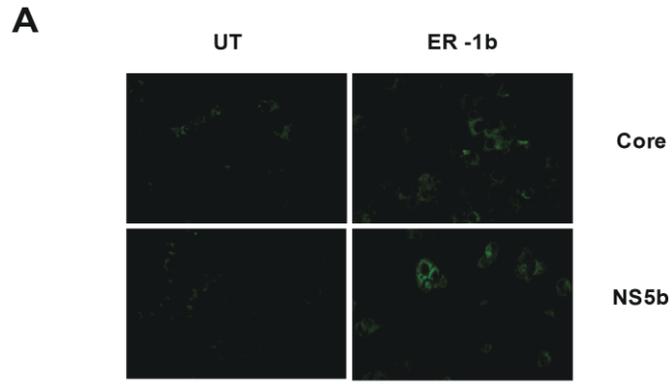


Figure 4.2

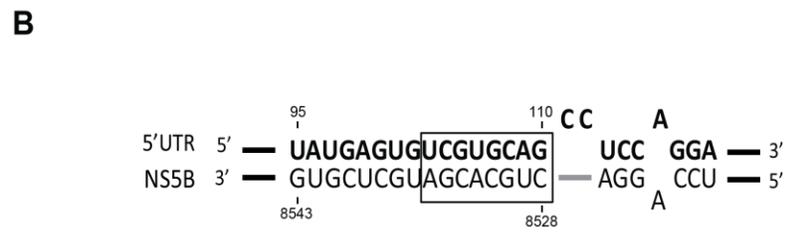
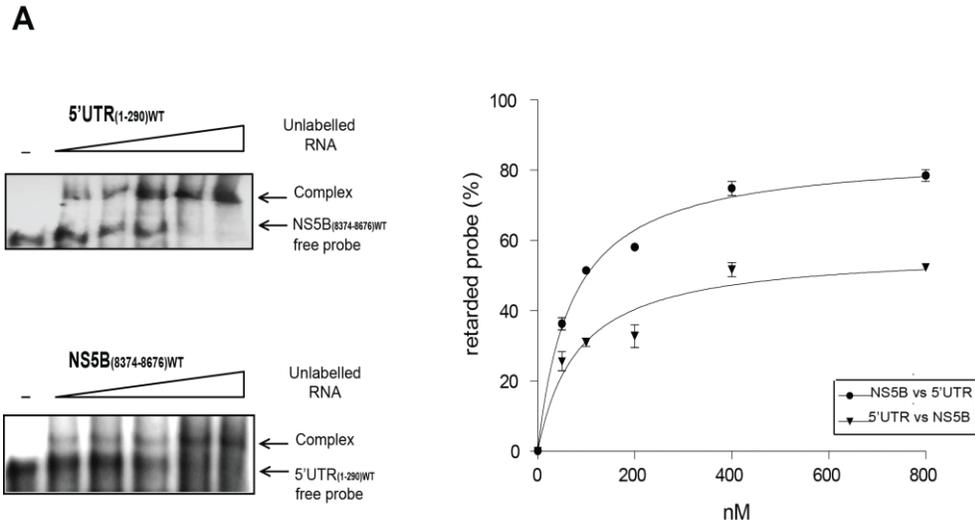
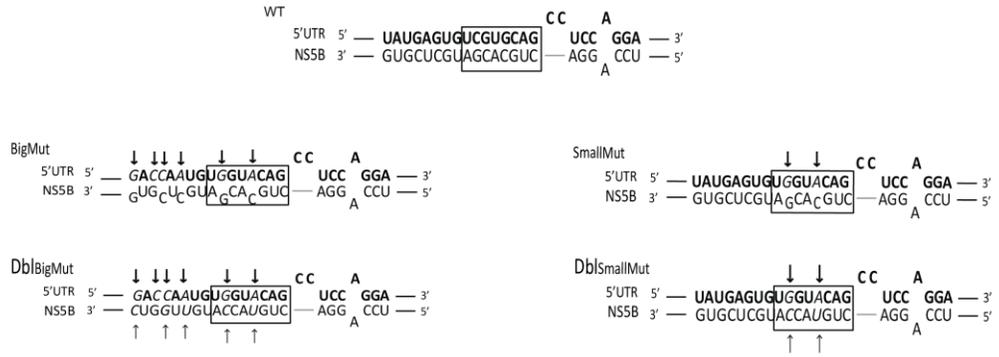
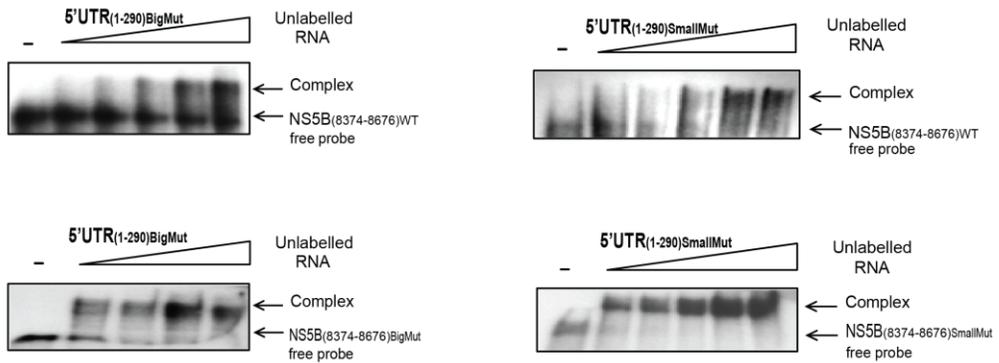


Figure 4.3

A



B



C

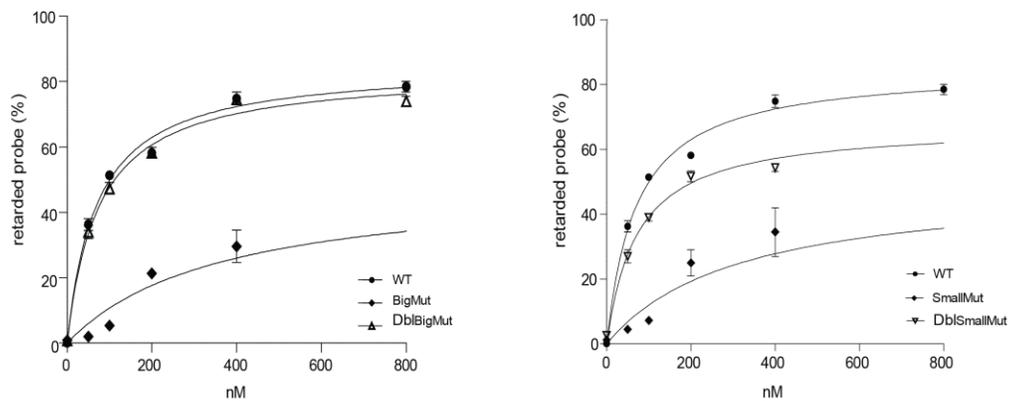
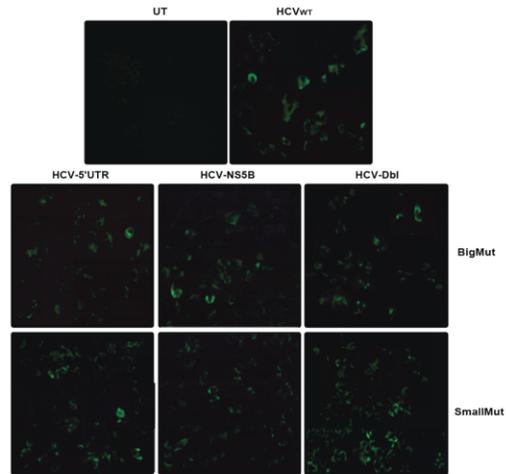
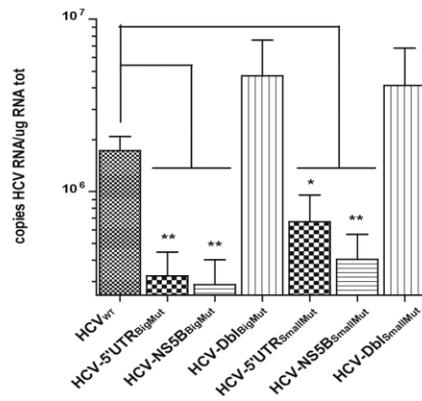


Figure 4.4

A



B



C

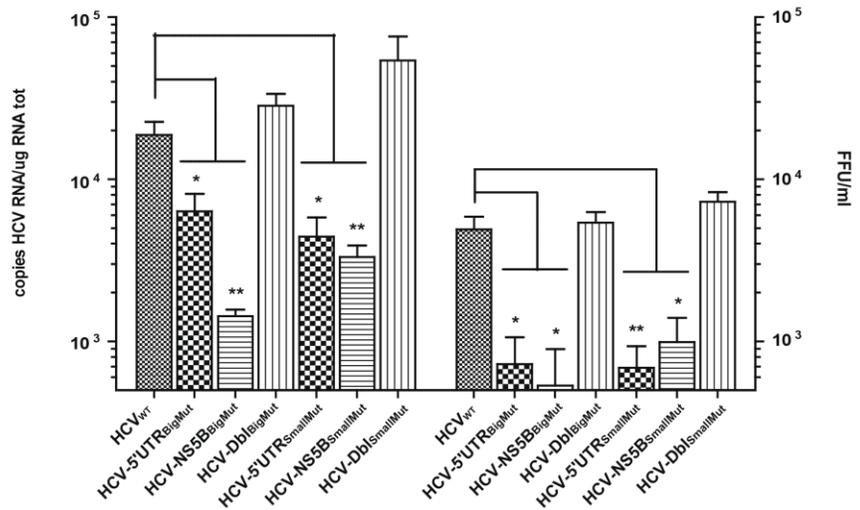
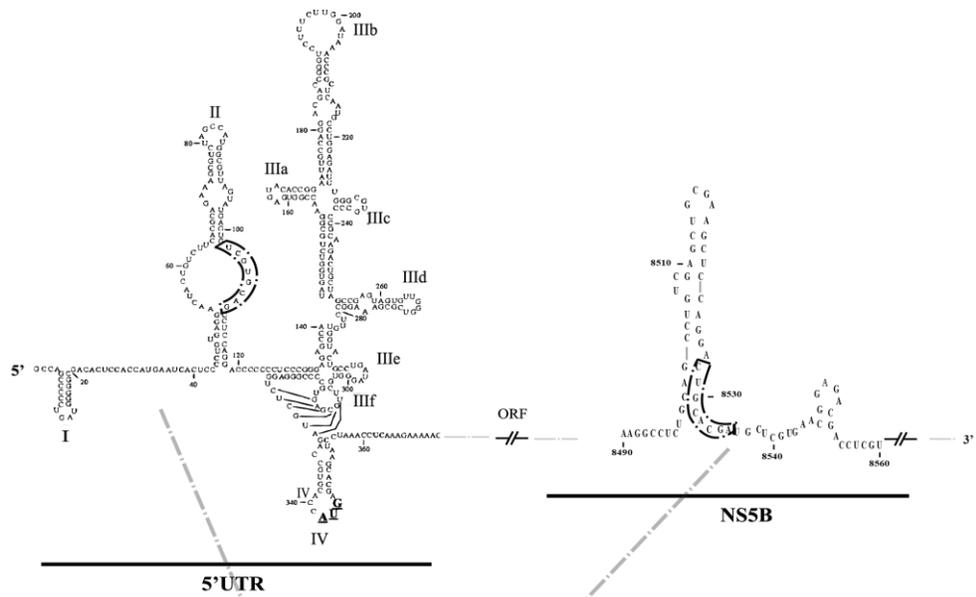


Figure 4.5



Sequences of LRI	Average of Identity with all HCV genotypes
5'UTR nt (95 - 110)	90%
NS5B nt (8528 - 8543)	70%

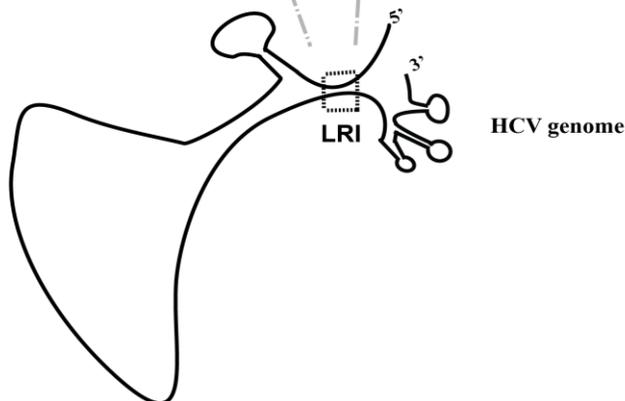
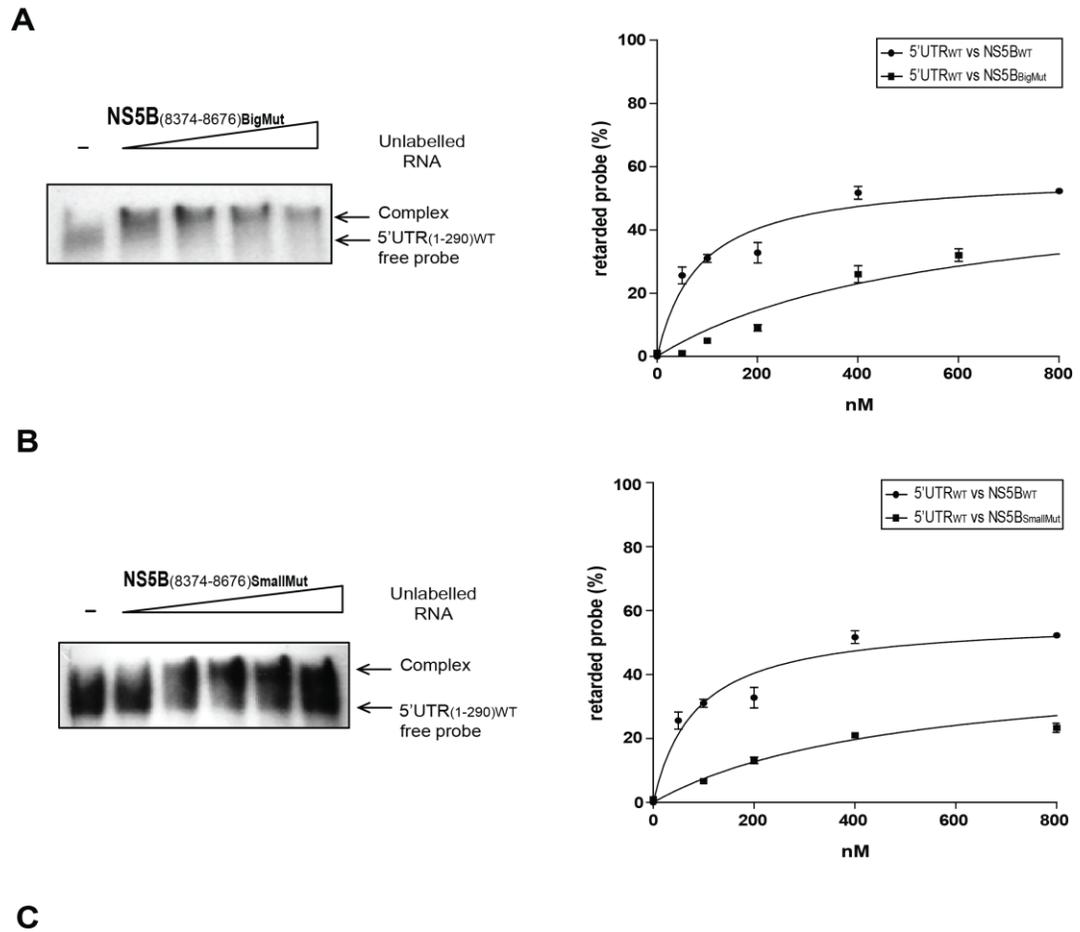


Figure 4.S1



C

Binding variables of the 5'UTR–NS5B RNAs interaction

RNA probe	Unlabelled RNA	Kd (nM)	Bmax (%)
5'UTR _{(1-290)WT}	NS5B _{(8374-8676)WT}	83.93 ± 21.17	57.32 ± 4.01
	NS5B _{(8374-8676)BigMut}	551.8 ± 151.1	54.77 ± 6.40
	NS5B _{(8374-8676)SmallMut}	489.8 ± 129.4	43.77 ± 5.14

Values are the means of three independent assays ± SD. K_d is the dissociation constant and B_{max} the amplitude of the binding reaction.

TRANSITION

Les résultats obtenus dans ce deuxième article démontrent l'existence d'une interaction distale ARN-ARN entre le domaine II du 5'UTR et la séquence codante (nt 8528-8543) de la polymérase NS5B. Ceci suggère que le génome du VHC pourrait adopter une conformation tertiaire particulière. De plus, il y est prouvé que cette interaction est nécessaire à une réplication virale efficace.

Les deux premiers articles de ma thèse mettent en évidence l'importance des structures ARN secondaires et tertiaires du génome du VHC dans son cycle viral. J'ai pu ainsi étudier l'effet de caractéristiques intrinsèques du virus (les éléments structurels du génome) sur son propre cycle de réplication et en démontrer l'importance.

Cependant les virus dépendent de la cellule qu'ils infectent pour réaliser leur cycle viral. Ils ont ainsi une relation particulière avec leur hôte car ils en exploitent les ressources et en détournent le fonctionnement à leur profit. La cellule en retour réagit à la présence de cette infection en activant certains processus de défenses antivirales. Dans le troisième et dernier article de ma thèse je me suis intéressée à une autre caractéristique qui influence le cycle viral du VHC : l'interaction virus-hôte. J'ai pu ainsi étudier l'effet d'une molécule inhibitrice d'un acteur clef de la réponse antivirale, sur la réplication du VHC.

La thalidomide est une molécule immuno-modulatrice qui a été utilisée pour réduire la fibrose du foie [417]. Or, son impact sur la réplication du VHC n'était pas connu. Ce troisième article a permis d'examiner l'effet de la thalidomide sur la réplication du VHC *in vitro* et ce faisant, a mis en évidence l'importance de la voie de signalisation NF- κ B dans le contrôle de la réplication du VHC.

Chapitre 5 : Article 3

INHIBITION OF I κ B KINASE BY THALIDOMIDE INCREASES HEPATITIS C VIRUS RNA REPLICATION

Running title: Thalidomide inhibits IKK to increase HCV RNA

E. Rance^{1,2}, J. E. Tanner¹ and C. Alfieri^{1,2}

¹Laboratory of Viral Pathogenesis, Research Center, Sainte-Justine University Hospital, Montreal, QC, Canada; and ²Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

Key words: fibrosis, interleukin-8, interferon- β , NF- κ B inhibitors, reticuloendotheliosis.

[**Status:** published in Journal of Viral Hepatitis. 2012, 19, e73–e80. doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01505.x_2011].

SUMMARY

Hepatic fibrosis is an integral element in the progression of chronic liver disease. Elevated hepatic interleukin (IL)-8 is an important contributor to fibrosis in patients chronically infected with the hepatitis C virus (HCV). Thalidomide has been used to reduce liver inflammation and fibrosis in HCV-infected patients, but its impact on HCV replication remains unclear. This study examined the effect of thalidomide on HCV replication in vitro. Results revealed that while thalidomide reduced IL-8 and nuclear factor kappa B (NF- κ B) activity by 95% and 46% in Huh-7 cells, increasing concentrations of thalidomide correlated with a linear rise in HCV replication (17-fold at 200 μ m). The NF- κ B inhibitors, wedelolactone and NF- κ B activation inhibitor-1, which mimic the actions of thalidomide by preventing phosphorylation and activation of I κ B kinase (IKK) and hence block NF- κ B activity, increased HCV RNA by 18- and 19-fold, respectively. During in vitro HCV replication in Huh-7 cells, we observed a 30% increase in IKK α protein and 55% decrease in NF- κ B(p65)/RelA protein relative to cellular β -actin. Ectopic expression of IKK α to enhance the inactive form of IKK in cells undergoing virus replication led to a 13-fold increase in HCV RNA. Conversely, enhanced expression of NF- κ B(p65)/RelA in infected cells resulted in a 17-fold reduction in HCV RNA. In conclusion, HCV RNA replication was significantly augmented by the inhibition of IKK activation and subsequent NF- κ B signalling, whereas a restoration of NF- κ B activity by the addition of NF- κ B/RelA markedly reduced HCV replication. This study lends added importance to the role of the NF- κ B signalling pathway in controlling HCV replication.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) affects 3% (170 million) of the world's population [1]. It is estimated that 30% of the chronically infected patients will develop liver fibrosis which, over time, leads to cirrhosis and hepatocellular carcinoma [2]. Extensive cirrhosis compromises liver function and is associated with high mortality (5-year survival rate of 50%).

Liver fibrosis is a consequence of persistent liver exposure to elevated proinflammatory cytokines in response to HCV antigens and/or to continued immune assault on virally infected hepatocytes [3]. Elevated cytokine levels promote liver stellate cell differentiation into myofibroblasts, whose over-expression, secretion and deposition of extracellular matrix proteins concomitant with a lessening of hepatic fibrolytic activity result in increased fibrosis.

The immunomodulatory anti-inflammatory drug, thalidomide, or its analogues [Lenalidomide (also known as Revlimid), Celgene Corporation, Summit, NJ, USA, CC-5013; CC-4047, ACTIMID] have been used to block inflammatory cytokine synthesis and treat autoimmune disease and cytokine-dependent cancers [4]. While thalidomide's success in reducing tumour necrosis factor (TNF) α - or transforming growth factor (TGF) β -induced liver fibrosis in animal models has made it an attractive fibrosis treatment option [5,6], its use and impact on HCV chronically infected individuals remains controversial. In one clinical study involving six chronically infected patients, thalidomide treatment was reported to lower blood HCV RNA to undetectable levels [7]. In contrast, two similar-sized clinical studies reported either no reduction in viral load [8] or a 14-fold increase in viral load compared with the expected value ($>5 \times 10^6$ copies/mL versus an expected $3.52 \times 10^5 \pm 4.8$) [9,10]. These conflicting reports point to a need for a more direct examination of the effect of thalidomide on HCV replication and prompted the *in vitro* experiments presented in this paper.

As prior studies have shown that thalidomide inhibited cytokine synthesis by blocking phosphorylation of I κ B kinase (IKK) and subsequent nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation [11,12] and that NF- κ B activity was reduced in HCV-infected hepatocytes [13], we hypothesized that thalidomide might amplify HCV RNA replication in infected cells through the inhibition of IKK signalling.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids.

pJFH1 was used to generate full-length HCV 2a RNA and virus [14] (kindly provided by Dr Takaji Wakita, Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan). The human interleukin (IL)-8-promoter reporter plasmid, pIL-8CAT2x(-80/-70), contains two IL-8 NF- κ B recognition sequences linked to the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene [15]. The IKK α and the NF- κ B(p65)/RelA expression plasmids, pIKK α [16] and pRSV-RelA (p65) [17], were obtained from Dr Elliot Kieff (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) and the NIH/AIDS Research and Reference Program (Germantown, MD, USA), respectively.

Cell culture and generation of virus stock.

We employed the pJFH1:Huh-7 hepatoma cell culture model to produce HCV [14]. The Huh-7 cell line was provided by Dr Tatsuo Takahashi (Health Science Research Resources Bank, Japan) and maintained in Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM; Invitrogen, Burlington, ON, USA) supplemented with 10% FBS and antibiotics.

Genomic-length HCV RNA synthesized in vitro from XbaI-linearized, mung bean nuclease-treated pJFH1 template and with the MEGAscript T7 polymerase transcription kit (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA) was used to generate virus stock. Synthetic HCV RNA was treated with RNase-free DNase (Applied Biosystems/Ambion Inc.) to remove DNA template, verified for size (9.6 kb) and product integrity by resolution in a 0.8% formaldehyde-agarose denaturing gel before organic extraction and suspension in sterile water. HCV RNA (10 µg) was electroporated (single pulse, 300 V and 950 µFD) into 6×10^6 Huh-7 cells suspended in 0.5 mL cold PBS. Following electroporation, Huh-7 cells were cultured in complete DMEM for 12 h to allow cell attachment. The medium was replaced, and culture was continued for an additional 48 h. Virus was harvested from culture medium after clearance of cell debris by low-speed centrifugation ($200 \times g$). Virus stock contained $\sim 3 \times 10^4$ infectious units (IU)/mL as measured by the fluorescence-forming unit (FFU) assay. This assay measures the number of NS5B-positive cells (anti-NS5B monoclonal antibody 1826; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) after 3 days in culture [18].

Hepatitis C virus replication in the presence of thalidomide, NF- κ B pathway inhibitors and following ectopic expression of I κ B kinase α and NF- κ B (p65)/Rel A.

Huh-7 cells were seeded in a six-well plate at 3×10^5 cells per well and infected with HCV (0.1 IU per cell). The cultures were grown for 18 h in the presence or absence of serial dilutions (50–200 μ m) of thalidomide (\pm -2-(2,6-dioxo-3-piperidiny)-1H-isoindole-1,3(2H)-dione, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 μ m IKK α / β inhibitor, wedelolactone (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA) or 13 nm NF- κ B activation inhibitor-1 [NAI-1, 6-amino-4-(phenoxyphenylethylamino) quinazoline; EMD Chemicals] [19]. The wedelolactone and NAI-1 concentrations selected were based on manufacturer recommendations [19,20]. Wedelolactone inhibits NF- κ B activity by blocking the phosphorylation of IKK α and IKK β , but has no effect on p38 MAP kinase or Akt [20]. NAI-1 inhibits NF- κ B signalling by preventing NF- κ B nuclear translocation through the inhibition of IKK phosphorylation [21]. Virally infected cells were exposed to comparable amounts of the inhibitor solvent, DMSO, to control for nonspecific inhibition by DMSO during virus replication.

At 2 days postinfection, the level of replicative viral RNA was determined by reverse transcriptase (RT)-quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using 1 μ g total RNA per assay [22]. Log₁₀ dilutions of synthetic JFH1 RNA in the range 10^4 – 10^9 served as reference standards.

To measure the effects of increased IKK or NF- κ B(p65)/RelA expression on HCV replication, a mixture of HCV RNA (5 μ g) and pcDNA3.1 (empty vector), pIKK α or pRSV-RelA(p65) (5 μ g) was single-pulsed electroporated into 6×10^6 Huh-7 cells. Following electroporation, cells were cultured in complete DMEM medium for 12 h to allow viable cells to attach. The medium was changed, and cells were cultured for an additional 24 h. RNA was

isolated from these cultures by organic extraction. Cell lysates from these cultures were also prepared for the immune-blot studies described later.

Inhibition of IL-8 expression by thalidomide and NF- κ B inhibitors.

Huh-7 cells seeded in a 24-well plate at 2×10^4 cells per well in DMEM complete medium and cultured overnight were washed twice with PBS, starved for 5 h in DMEM medium containing 0.5% FBS and treated with 20 ng/mL TNF α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) to induce IL-8 expression [23]. Cells were grown for an additional 18 h in the presence or absence of 200 μ m thalidomide, 10 μ m wedelolactone or 13 nm NAI-1. Cells were also exposed to comparable amounts of the inhibitor solvent DMSO to control for the nonspecific inhibition of IL-8 expression. The concentration of thalidomide used to inhibit IL-8 expression in Huh-7 cells was shown previously to reduce fibrosis in hepatic stellate cells and to decrease levels of inflammatory cytokines in lung macrophages [5,24]. Concentrations of wedelolactone and NAI-1 used to inhibit IL-8 expression have been reported to inhibit TNF α -induced expression of IL-6 [25] and LPS induction of TNF α , respectively [21].

After 18 h, the culture medium was harvested and clarified by centrifugation at 13000 \times g. IL-8 concentrations were determined using a human IL-8-specific ELISA (Biosource, Camarillo, CA, USA). In experiments assessing NF- κ B transcriptional activity, Huh-7 cells were transfected with pIL-8CAT2x(-80/-70) [15], which contains two NF- κ B recognition sites, and treated with TNF α prior to exposure to thalidomide, wedelolactone or NAI-1. NF- κ B activity was measured as the CAT stimulation index [15]. The CAT stimulation index was determined by measuring CAT by ELISA (Roche Diagnostics Canada, Montreal, QC, Canada) after normalization for total amount of cell protein found in 200 μ L of cell lysate. Transfection

efficiencies were measured using the pCMV-GFP expression plasmid and counting the number of green fluorescence protein-expressing cells 24 h after transfection.

Cell metabolic assay.

The effect of thalidomide, NF- κ B inhibitors and DMSO on overall cell metabolism was measured spectroscopically (at $\lambda = 490$ nm) by catabolic reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS; Promega, Madison, WI, USA). Huh-7 cells seeded in triplicate in a 96-well plate at 2×10^4 cells per well were cultured for 2 days with 200 μ M thalidomide, 10 μ M wedelolactone, 13 nM NAI-1 or a comparable amount of DMSO before addition of MTS during the final 4 h of culture. Cell metabolism was measured spectroscopically from the accumulation of the catabolic product formazan.

Immunoblot assays.

The endogenous or ectopic expression of IKK α or NF- κ B(p65)/RelA was measured by immunoblot. Cell lysates from transfected cultures were dissolved in buffer containing SDS and β -mercaptoethanol for resolution in a 10% SDS-PAGE gel followed by immunoblot. IKK α and NF- κ B(p65)/RelA proteins were detected using CHUK monoclonal antibody clone 14A231 or RelA monoclonal antibody (MO1) clone 8G3 (Abnova, Walnut, CA, USA), respectively, in conjunction with biotinylated goat F(ab)₂ anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), horseradish peroxidase (HRP)-streptavidin (Sigma-Aldrich) and chemiluminescence substrate (Sigma-Aldrich). IKK α and NF- κ B RelA protein contents among cell samples were normalized using cellular β -actin protein. Actin was detected by immunoblot

using rabbit anti-actin antibody (Sigma-Aldrich) in conjunction with HRP-goat F(ab)₂ anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich). Relative signal intensity was measured by the ImageJ program (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

Analysis of hepatitis C virus receptor CD81 expression following thalidomide treatment.

Huh-7 cells cultured for 24 h in the presence or absence of 200 µM thalidomide were assessed for changes in CD81 expression. Cells were gently removed from the culture dish using versene, pelleted by centrifugation and incubated in 200 µL PBS containing 10 µg/mL anti-CD81 monoclonal 1.3.3.11 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) or an equal amount of isotype-matched anti-TNP monoclonal antibody (BD Biosciences, Mississauga, ON, USA). Bound antibody was detected using biotin-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) and dichlorotriazinyl amino-fluorescein-conjugated streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Cell fluorescence was measured by FACS analysis.

RESULTS

Thalidomide increases hepatitis C virus RNA replication.

Infection of Huh-7 cells with HCV in the presence of increasing concentrations of thalidomide resulted in a corresponding linear increase in replicative (–) strand HCV RNA as measured by RT-qPCR (figure 5.1). At a concentration of 200 µM, thalidomide increased replicative RNA by 17-fold ±4 SEM (P = 0.013, n = 3) compared with HCV-infected Huh-7 cells grown in the absence of thalidomide. Based on prior studies showing that thalidomide inhibits cytokine synthesis by blocking IKK phosphorylation and subsequent NF-κB activation

[11,12], we hypothesized that thalidomide increased HCV RNA replication by inhibiting this member of the NF- κ B signalling pathway.

Thalidomide and IKK inhibitors block IL-8 protein synthesis and NF- κ B transcription activity in Huh-7 cells.

Elevated IL-8 levels in the liver of chronically infected individuals represent a key factor in the transition from mild-to-severe liver fibrosis [26]. Thalidomide is reported to reduce TNF α -induced IL-8 levels in endometriotic stromal cells [27]. To validate that thalidomide acts similarly in Huh-7 hepatoma cells to inhibit TNF α induction of IL-8 expression [23], exogenous TNF α was added to Huh-7 cell cultures grown in the presence or absence of thalidomide. As thalidomide was reported to inhibit cytokine synthesis by blocking IKK, we also used the IKK-specific inhibitors wedelolactone and NAI-1 that were expected to mimic the action of thalidomide on IKK and thus block IL-8 expression [12]. Results indicate that thalidomide reduced IL-8 expression in Huh-7 cells following TNF α stimulation by 95%. Wedelolactone and NAI-1 acted comparably, reducing IL-8 synthesis to undetectable levels and by 84%, respectively (figure 5.2a).

Our laboratory previously showed that the induction of IL-8 by proinflammatory cytokines was mediated in part through the activation of the IL-8 promoter and requires NF- κ B transcription factors [15,28]. To verify that thalidomide and the selected IKK inhibitors could exert an inhibitory effect on TNF-mediated NF- κ B transcriptional activity in hepatoma cells, Huh-7 cells were transfected with a CAT-reporter plasmid containing two IL-8-NF- κ B recognition sequences and stimulated with TNF α in the presence or absence of thalidomide or IKK inhibitors. We observed that NF- κ B-driven promoter activity was reduced by 46%, 57% and 51% after addition of thalidomide, wedelolactone and NAI-1, respectively (figure 5.2b).

These results indicate that thalidomide and IKK inhibitors can block IL-8 expression in Huh-7 cells and that IL-8 inhibition was mediated in large part through the inhibition of IKK and NF- κ B.

The inhibition of IL-8 expression and the loss of NF- κ B promoter activity by thalidomide and the IKK inhibitors were not caused by chemical cytotoxicity. Culture of Huh-7 cells in thalidomide, wedelolactone, NAI-1 or their organic solvent DMSO showed no more than a 10% variation in MTS catabolism compared with untreated Huh-7 cells (figure 5.3a). Also, addition of thalidomide did not alter expression of a key physiologic marker essential to HCV infection, namely CD81. Huh-7 cells grown in the presence or absence of thalidomide and assayed for changes in the HCV receptor, CD81 [29], showed no significant difference in CD81 levels following thalidomide treatment (figure 5.3b). The mean fluorescence peak (MFP) of CD81 for Huh-7 cells grown in the presence of thalidomide revealed only a 4% increase in MFP (MFPlog10 of 3.25 for cells treated with DMSO versus MFPlog10 of 3.38 for cells treated with thalidomide). Taken together, these results indicate that thalidomide inhibits IL-8 expression and NF- κ B activity in hepatoma cells through the inhibition of IKK.

Inhibition of IKK promotes hepatitis C virus RNA replication.

To rule out the possibility that thalidomide increased HCV replication by a mechanism unrelated to IKK, wedelolactone and NAI-1 were tested to see whether their inhibition of IKK activation increased HCV replication. Addition of the IKK inhibitors to Huh-7 cells undergoing HCV replication stimulated HCV RNA replication. Addition of wedelolactone or NAI-1 increased HCV RNA by 17.7- and 19-fold (P-values <0.01 and 0.001), respectively (figure

5.4). This compared favourably with parallel experiments in which thalidomide increased HCV viral RNA by 12-fold (figure 5.4).

Increased IKK α and NF- κ B(p65)/RelA, respectively, enhanced or inhibited HCV replication.

To determine whether the increase in HCV RNA replication observed following addition of thalidomide or the IKK chemical inhibitors was because of their direct action on IKK, HCV RNA was co-electroporated into Huh-7 cells along with IKK α or NF- κ B(p65)/RelA expression plasmids. If thalidomide acted directly on IKK, then an increase in the inactive form of cellular IKK α should act as a block in NF- κ B signalling and is expected to result in an increase in HCV replication. Conversely, increasing free cellular NF- κ B(p65)/RelA should bypass endogenous IKK suppression and increase NF- κ B transcriptional activity. As shown in figure 5.5 (top panel, left blot), Huh-7 cells undergoing normal HCV replication and in the absence of any inhibitors show a 30% increase in IKK α protein relative to cellular β -actin and uninfected cells. This level of IKK α was increased eightfold compared to infected cells following ectopic plasmid expression (figure 5.5, top panel, left blot). In parallel, NF- κ B(p65)/RelA protein levels decreased by 55% in Huh-7 cells undergoing normal HCV replication compared to uninfected cells (figure 5.5, top panel, right blot). Ectopic expression of NF- κ B(p65)/RelA resulted in a 6-fold increase in the level of NF- κ B(p65)/RelA compared to infected cells (figure 5.5, top panel, right blot). Following HCV RNA and expression plasmid co-electroporation and continued virus replication, we observed a 13-fold increase in HCV RNA in Huh-7 cells expressing heightened levels of IKK α (figure 5.5, bottom panel, black histogram). We also observed a 17-fold decrease in HCV RNA following increased NF- κ B(p65) expression (figure 5.5, bottom panel, grey histogram). These results demonstrate

that increasing the inactive form of IKK by augmented expression results in increased HCV replication. Conversely, restoring NF- κ B/RelA activity to levels above that found during normal virus infection markedly reduced HCV RNA replication. These results indicate that IKK- and concomitant NF- κ B-activation status is a key focal point in the control of HCV replication.

DISCUSSION

Thalidomide's success in reducing TNF α -induced liver fibrosis in animal models would make it an attractive treatment option for use in HCV-infected individuals; however, its direct impact on HCV replication in liver cells had heretofore not been studied.

Hepatic fibrosis is an integral element in the progression of chronic liver disease to cirrhosis and hepatocellular carcinoma [30]. Chronic HCV infection and elevated hepatic IL-8, among other cytokines and growth factors, are important contributors to liver fibrosis [26,31]. Although thalidomide reduced IL-8 levels (figure 5.2), we noted that increasing amounts of thalidomide corresponded, in a dose-dependent manner, with increased HCV RNA replication. At the concentration of 200 μ m, thalidomide increased viral replicative RNA by 17-fold \pm 4 SEM (P = 0.013) as compared to HCV-infected cells grown in the absence of thalidomide (figure 5.1). This is the first report to clearly demonstrate that thalidomide can increase HCV replication.

The increase in viral RNA replication did not appear because of an overall enhancement of cell metabolism or an increase in the infectability of hepatoma cells. Measurement of overall cell metabolism and expression of the principal HCV receptor, CD81, following thalidomide

exposure showed differences of <10% and 4%, respectively, compared with sham (DMSO)-treated cells (figure 5.3). The observation that thalidomide or like-acting IKK inhibitors yielded comparable increases in HCV RNA (thalidomide, 12-fold versus IKK inhibitors, 17.7- to 19-fold, figure 5.4) strongly suggests that thalidomide's direct action on IKK was the cause of increased virus replication. As further support for this postulate, when Huh-7 cells were transfected with IKK α expression plasmid to increase the inactive form of IKK and the cells were allowed to undergo continued replication, HCV RNA increased 13-fold compared with parallel sets of Huh-7 cells transfected with empty vector plasmid and HCV RNA (figure 5.5, bottom panel, black histogram). Conversely, increasing free cellular NF- κ B during virus replication by ectopic expression of RelA resulted in a 17-fold decrease in HCV RNA when compared with cells transfected with HCV RNA and empty vector plasmid (figure 5.5, bottom panel, grey histogram). These results indicate that the IKK complex is a focal point in the control of HCV replication. These results also suggest that blocking IKK and subsequent NF- κ B activity by thalidomide may, under certain conditions, augment virus replication in treated patients [9,10].

Insight into the mechanism of how thalidomide's inhibition of IKK and NF- κ B augments HCV replication in vitro might be obtained by aligning those cellular processes most affected by, and in common with, thalidomide and HCV replication. NF- κ B and interferon regulatory factor (IRF)-3 play critical roles in the response of liver cells to HCV infection by prompting the expression of antiviral cytokines and IFN- β , respectively [32,33]. Activation of NF- κ B and IRF-3 involves the recognition and binding of HCV or viral RNA to Toll-like receptors (TLR) located on the cell surface and within membrane-bound cytosolic vesicles [32]. Activation of TLR ultimately leads to the phosphorylation/activation of IKK α or IKK β contained in the IKK complex [34]. The IKK complex, which consists of the two controlling

kinases, namely IKK α and IKK β , and an effector kinase IKK γ subsequently phosphorylate I κ B, leading to the degradation of I κ B, the release of NF- κ B and cytokine expression. For most cells, cytokine expression is driven by the NF- κ B heterodimer form comprised of RelA and p50 proteins [35]. Interestingly, NS5B was shown to inhibit NF- κ B signalling by blocking IKK [36]. Thalidomide's additional block of IKK would negatively add to NS5B inhibition of NF- κ B and augment virus replication.

Toll-like receptor recognition of virus or viral RNA also leads to the phosphorylation and dimerization of IRF-3 for the initial activation of IFN- β . Although IRF-3 is typically activated by the inducible IKK (IKK-i) and TBK1 [TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1], activated IKK α can also phosphorylate/activate IRF-3 [37]. As NS3/4 is known to cleave IRF-3 [38], thalidomide's additional block of IRF-3 activation would further enhance virus replication.

We observed that during HCV replication in Huh-7 cells, NF- κ B/RelA protein decreased by 55% (figure 5.5, top panel, right blot). Although HCV core and NS5A proteins increase NF- κ B activity in vitro if expressed as individual proteins [39,40], during typical HCV replication, NF- κ B is suppressed [41]. Further, NF- κ B (RelA) protein levels are reported to be low in HCV-infected hepatocytes within the liver tissue of chronically infected patients [13]. Our finding that increasing RelA protein levels during virus replication reduced HCV RNA 17-fold suggests an important role for RelA in preventing virus replication. Support for this contention comes from a recent study using a RNA virus-mouse fibroblast model in which RelA protein was found to be crucial for initiation of IFN- β expression and blockage of virus replication when IRF-3 activity was low [42]. Given that IRF-3 protein levels are low during HCV replication owing to NS3/4 cleavage, and our observation that added expression of

NF- κ B/RelA strongly inhibits virus replication (figure 5.5, bottom panel, grey histogram), we speculate that an increase in RelA protein may circumvent lost IRF-3 signalling to block HCV RNA replication.

In conclusion, HCV RNA replication was shown to be significantly augmented by the anti-inflammatory drug, thalidomide, by IKK chemical inhibitors and by increased expression of the inactive form of IKK α . In contrast, increased levels of NF- κ B/RelA reduced HCV replication. This work adds important new evidence to the role of the NF- κ B signalling pathway in controlling HCV replication.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Canadian Institutes for Health Research, grant #82572. ER received a doctoral studentship from the Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal. The authors thank Dr Françoise LeDeist and Rose-Marie Brito for their assistance with the FACS analysis.

DISCLOSURES

Elodie Rance, Jerome E. Tanner and Caroline Alfieri have no disclosures or competing interests to declare.

ABBREVIATIONS

HCC, hepatocellular carcinoma; TNF, tumor necrosis factor; TGF, transforming growth factor; interleukin, IL; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; NF- κ B, nuclear factor kappa B; IKK, ($I\kappa$ B, κ B inhibitor) kinase; RelA, reticuloendotheliosis; RSV, Rous Sarcoma virus; Huh, human hepatoma cell line; IU, infectious units; FFU, fluorescence-forming unit; NS, nonstructural; NAI, NF- κ B activation inhibitor; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; HRP, horseradish peroxidase; CD, cluster of differentiation; DTAF, dichlorotriazinyl amino fluorescein; MFP, mean fluorescence peak; IFN, interferon; TLR, Toll-like receptors; TIR, Toll-IL-1 receptor; Myd88, myeloid differentiation factor 88; IRAK, IL-1R-associated kinase; Tollip, Toll interacting protein; TRAF, tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor; TRIF, TIR domain-containing adaptor-inducing interferon; TAK, TGF β -activating kinase; IRF, interferon regulatory factor; RIG, retinoic acid-inducible gene; TBK, TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase; MAVS, mitochondrial antiviral signalling.

REFERENCES

1. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat* 1999; 1: 35–47.
2. Mehta G, Rothstein KD. Health maintenance issues in cirrhosis. *Med Clin North Am* 2009; 93: 901–915, viii–ix.
3. Spengler U, Nattermann J. Immunopathogenesis in hepatitis C virus cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2007; 3: 141–155.
4. Teo SK, Stirling DI, Zeldis JB. Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product. *Drug Discov Today* 2005; 2: 107–114.
5. Chong LW, Hsu YC, Chiu YT, Yang KC, Huang YT. Anti-fibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2006; 3: 403–418.
6. Yang YY, Lee KC, Huang YT et al. Inhibition of hepatic tumour necrosis factor-alpha attenuates the anandamide-induced vasoconstrictive response in cirrhotic rat livers. *Liver Int* 2009; 5: 678–685.
7. Caseiro MM. Treatment of chronic hepatitis C in non-responsive patients with pegylated interferon associated with ribavirin and thalidomide: report of six cases of total remission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 2: 109–112.

8. Milazzo L, Biasin M, Gatti N et al. Thalidomide in the treatment of chronic hepatitis C unresponsive to alfa-interferon and ribavirin. *Am J Gastroenterol* 2006; 2: 399–402.
9. Schijman A, Colina R, Mukomolov S et al. Comparison of hepatitis C viral loads in patients with or without coinfection with different genotypes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 2: 433–435.
10. Raufman JP, Lamps LW. Thalidomide-induced normalization of serum ALT levels in a patient with hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2001; 11: 3209–3211.
11. Muriel P. NF-kappaB in liver diseases: a target for drug therapy. *J Appl Toxicol* 2009; 2: 91–100.
12. Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Baldwin AS Jr. Inhibition of NFkappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. *J Biol Chem* 2001; 25: 22382–22387.
13. Boya P, Larrea E, Sola I et al. Nuclear factor-kappa B in the liver of patients with chronic hepatitis C: decreased RelA expression is associated with enhanced fibrosis progression. *Hepatology* 2001; 5: 1041–1048.
14. Wakita T, Pietschmann T, Kato T et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 7: 791–796.
15. Roux P, Alfieri C, Hrimech M, Cohen EA, Tanner JE. Activation of transcription factors NF-kappaB and NFIL-6 by human immunodeficiency virus type 1 protein R (Vpr) induces interleukin-8 expression. *J Virol* 2000; 10: 4658–4665.

16. Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 1997; 2: 373–383.
17. Duckett CS, Perkins ND, Kowalik TF et al. Dimerization of NF-KB2 with RelA(p65) regulates DNA binding, transcriptional activation, and inhibition by an I kappa B-alpha (MAD-3). *Mol Cell Biol* 1993; 3: 1315–1322.
18. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc* 2006; 5: 2334–2339.
19. Tobe M, Isobe Y, Tomizawa H et al. Discovery of quinazolines as a novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation. *Bioorg Med Chem* 2003; 3: 383–391.
20. Kobori M, Yang Z, Gong D et al. Wedelolactone suppresses LPS induced caspase-11 expression by directly inhibiting the IKK complex. *Cell Death Differ* 2004; 1: 123–130.
21. Tobe M, Isobe Y, Tomizawa H, Nagasaki T, Takahashi H, Hayashi H. A novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation: structure-activity relationships and biological effects of 6-aminoquinazoline derivatives. *Bioorg Med Chem* 2003; 18: 3869–3878.
22. Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T et al. Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* 1999; 3: 636–642.
23. Kohsaka T, Yuan ZR, Guo SX et al. The significance of human jagged 1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia. *Hepatology* 2002; 1: 904–912.

24. Ye Q, Chen B, Tong Z et al. Thalidomide reduces IL-18, IL-8 and TNF-alpha release from alveolar macrophages in interstitial lung disease. *Eur Respir J* 2006; 4: 824–831.
25. Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Iida H, Dohi S, Kozawa O. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 16.
26. Asselah T, Bieche I, Laurendeau I et al. Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 6: 2064–2075.
27. Yagyu T, Kobayashi H, Matsuzaki H et al. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 expression in endometriotic stromal cells, possibly through suppression of nuclear factor-kappaB activation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 5: 3017–3021.
28. Tanner JE. Nucleosomes activate NFkappaB in endothelial cells for induction of the proangiogenic cytokine IL-8. *Int J Cancer* 2004; 1: 155–160.
29. Zhang J, Randall G, Higginbottom A, Monk P, Rice CM, McKeating JA. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 2004; 3: 1448–1455.
30. Gieling RG, Burt AD, Mann DA. Fibrosis and cirrhosis reversibility - molecular mechanisms. *Clin Liver Dis* 2008; 4: 915–937, xi.
31. Lim YS, Kim WR. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease. *Clin Liver Dis* 2008; 4: 733–746, vii.

32. Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 2005; 9: 469–476.
33. Hiscott J, Nguyen TL, Arguello M, Nakhaei P, Paz S. Manipulation of the nuclear factor-kappaB pathway and the innate immune response by viruses. *Oncogene* 2006; 51: 6844–6867.
34. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 693–733.
35. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van AD, Miyamoto S. Rel/NFkappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995; 22: 2723–2735.
36. Choi SH, Park KJ, Ahn BY, Jung G, Lai MM, Hwang SB. Hepatitis C virus nonstructural 5B protein regulates tumor necrosis factor alpha signaling through effects on cellular IkappaB kinase. *Mol Cell Biol* 2006; 8: 3048–3059.
37. Wang RP, Zhang M, Li Y et al. Differential regulation of IKK alpha-mediated activation of IRF3/7 by NIK. *Mol Immunol* 2008; 7: 1926–1934.
38. Binder M, Kochs G, Bartenschlager R, Lohmann V. Hepatitis C virus escape from the interferon regulatory factor 3 pathway by a passive and active evasion strategy. *Hepatology* 2007; 5: 1365–1374.
39. Liao QJ, Ye LB, Timani KA et al. Hepatitis C virus non-structural 5A protein can enhance full-length core protein-induced nuclear factor-kappaB activation. *World J Gastroenterol* 2005; 41: 6433–6439.

40. Yoshida H, Kato N, Shiratori Y et al. Hepatitis C virus core protein activates nuclear factor kappa B-dependent signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factor. *J Biol Chem* 2001; 19: 16399–16405.
41. Szabo G, Dolganiuc A. Hepatitis C and innate immunity: recent advances. *Clin Liver Dis* 2008; 3: 675–692, x.
42. Wang J, Basagoudanavar SH, Wang X et al. NF-kappa B RelA subunit is crucial for early IFN-beta expression and resistance to RNA virus replication. *J Immunol* 2010; 3: 1720–1729.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 5.1. Thalidomide increased replicative (–) strand RNA in hepatitis C virus (HCV)-infected Huh-7 cells.

Huh-7 cells were infected with 3×10^4 FFU/mL of HCV in the presence of increasing concentrations of thalidomide. Two days postinfection, the amount of HCV RNA was measured by RT-qPCR. Virus genome copies found in virally infected cells ($4.9 \pm 3.1 \times 10^4$ SEM genome copies/ μ g RNA) were given a stimulation index value of 1 in each of three independent experiments. Virus titres were normalized for each thalidomide concentration. Results are plotted as a linear regression of relative increase in HCV RNA \pm SEM increase versus thalidomide concentration for three separate experiments.

Figure 5.2. Thalidomide inhibits IL-8 expression and NF- κ B activity in Huh-7 cells.

(a) Inhibition of TNF α -induced IL-8 following addition of 200 μ M thalidomide, 10 μ M wedelolactone and 13 nM NAI-1. (b) Inhibition of NF- κ B promoter activity, as measured by CAT ELISA, following addition of 100 μ M thalidomide, 10 μ M wedelolactone and 13 nM NAI-1. P-value ≤ 0.05 (*) or ≤ 0.01 (***) was determined for panel (a) by the Student's t-test for three separate experiments.

Figure 5.3. (a) Huh-7 cell metabolism was measured colorimetrically using MTS following culture for 48 h in medium alone (untreated, UT), 1.25% DMSO (maximum cell exposure concentration), thalidomide (200 μ M), wedelolactone (10 μ M), or NAI-1 (13 nM). Results are depicted as % change in MTS turnover versus untreated cells. (b) Expression of CD81, as

measured by FACS, for Huh-7 cells grown for 48 h in the presence or absence of 200 μM thalidomide.

Figure 5.4. Thalidomide and NF- κB inhibitors increased replicative.

RNA in hepatitis C virus (HCV)-infected Huh-7 cells. Huh-7 cells were infected with 3×10^4 FFU/mL in the presence of 200 μM thalidomide, 10 μM wedelolactone or 13 nM NAI-1. Two days postinfection, HCV RNA was measured by RT-qPCR. Results are plotted as the relative stimulation index \pm SEM and based on three independent experiments. P-values were determined by the Student's t-test, and values of $P \leq 0.01$ (**) or $P \leq 0.001$ (***) are indicated. Cells infected with HCV in the absence of inhibitors averaged 1×10^7 viral genome copies/ μg cellular RNA.

Figure 5.5. Increased hepatitis C virus (HCV) RNA in cells expressing heightened amounts of I κB kinase (IKK) α and NF- κB (p65)/RelA protein.

(Top panel) Immunoblots of IKK α (left blot) and NF- κB (p65)/RelA (right blot) found in Huh-7 cells (untreated, UT) or 2 days postelectroporation of HCV RNA (5 μg) in conjunction with 5 μg of vector plasmid (HCV), IKK α (HCV + IKK α) or NF- κB (p56)/RelA (HCV + (p65)/RelA) expression plasmids. (Bottom panel) Two days postelectroporation, HCV RNA was measured by RT-qPCR. Results were plotted as the average HCV RNA stimulation index from three individual experiments \pm SEM and calculated relative to Huh-7 cells, which received HCV RNA and empty vector. P-values ≤ 0.01 (**) were determined by the Student's t-test. Cells infected with HCV and in the absence of expression plasmids showed, on average, 9.8×10^8 viral copies/ μg RNA.

FIGURES

Figure 5.1.

Rance *et al.*, Figure 1.

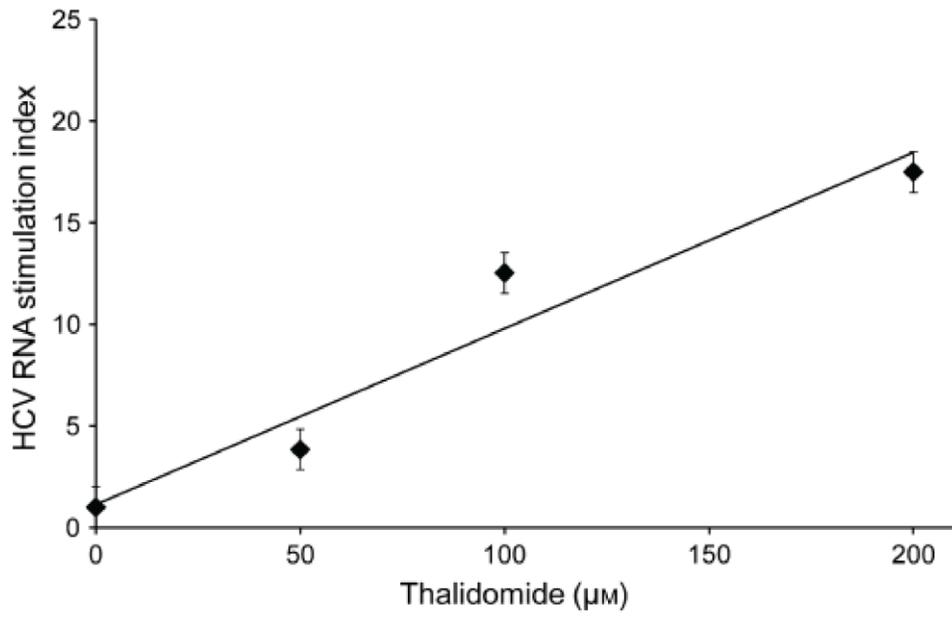


Figure 5.2

Rance *et al.*, Figure 2.

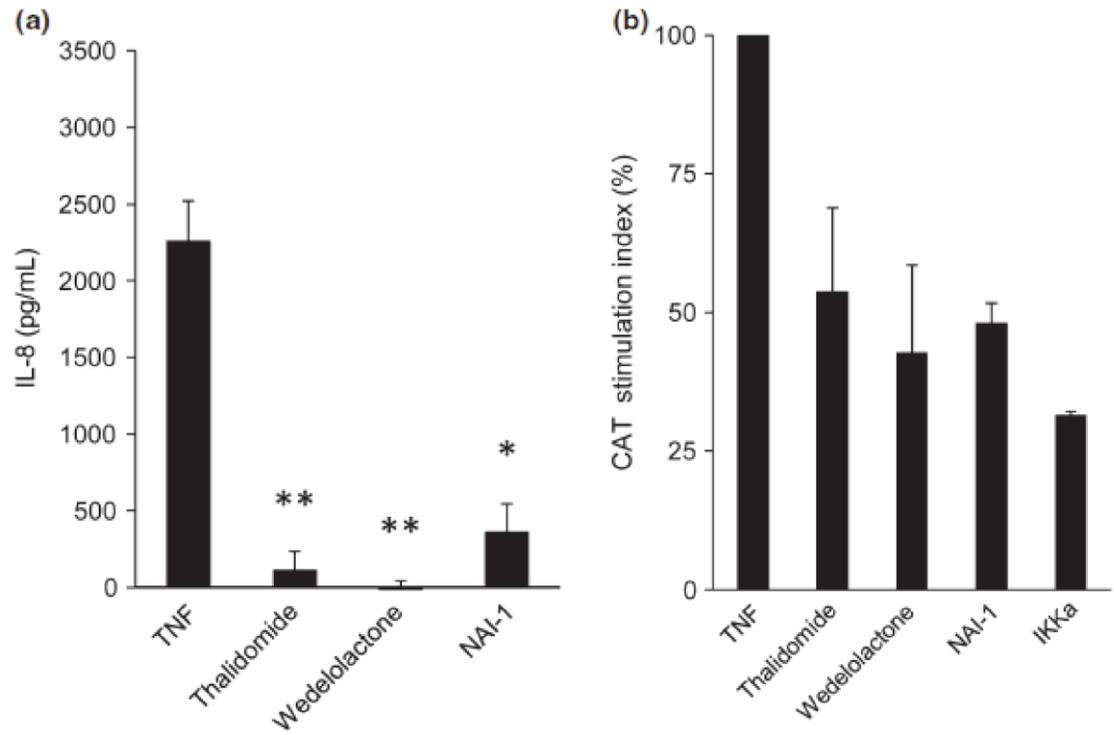


Figure 5.3

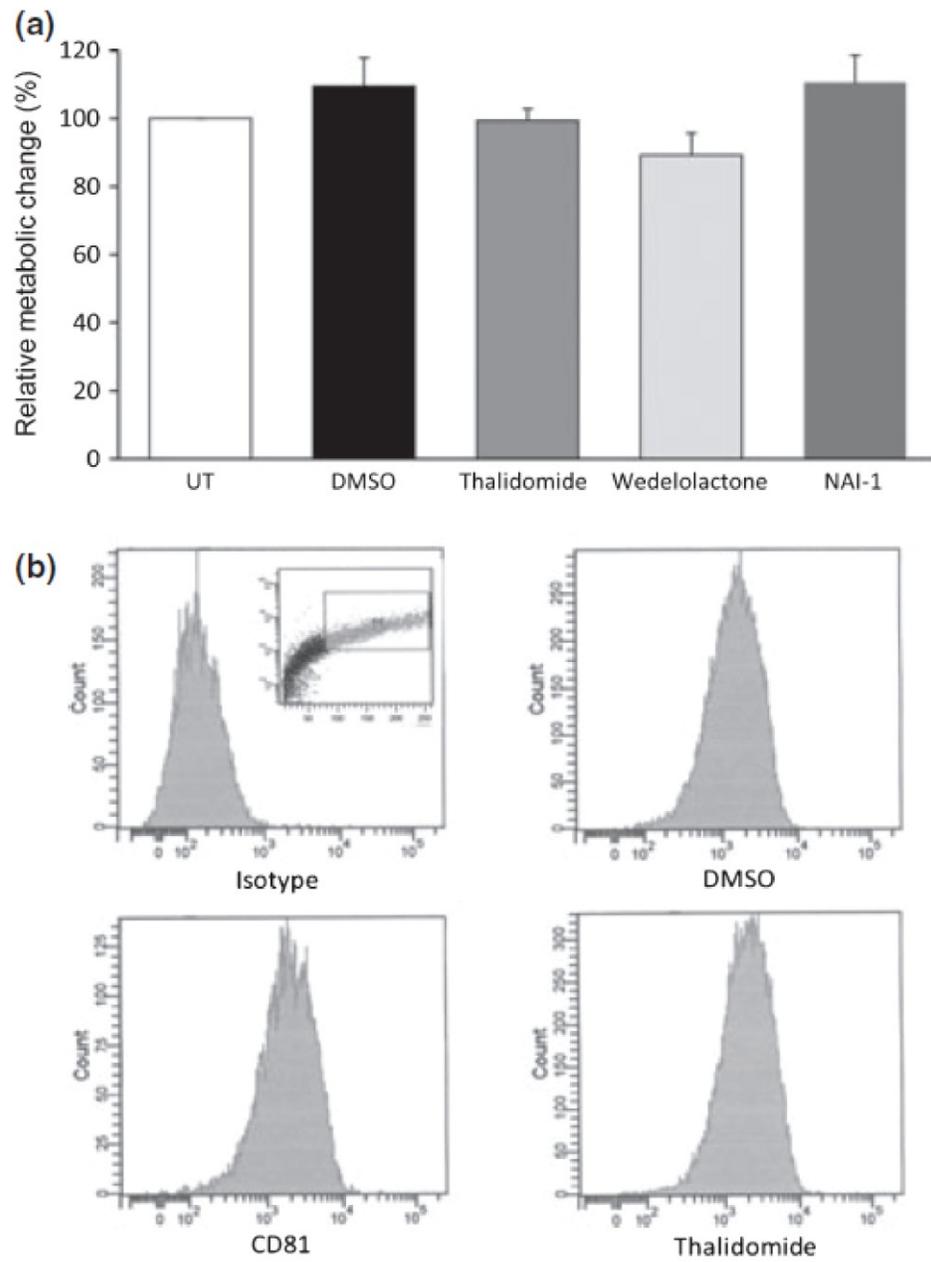
Rance *et al.*, Figure 3.

Figure 5.4

Rance *et al.*, Figure 4.

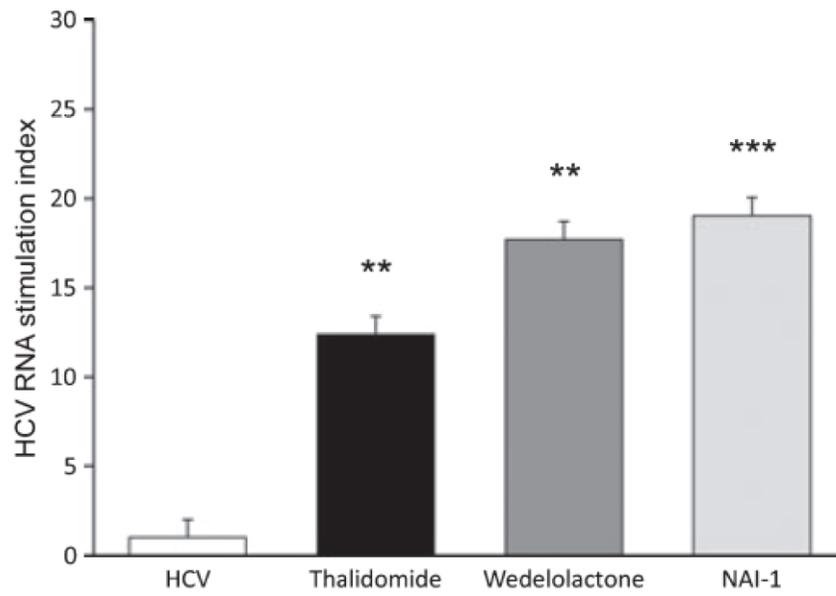
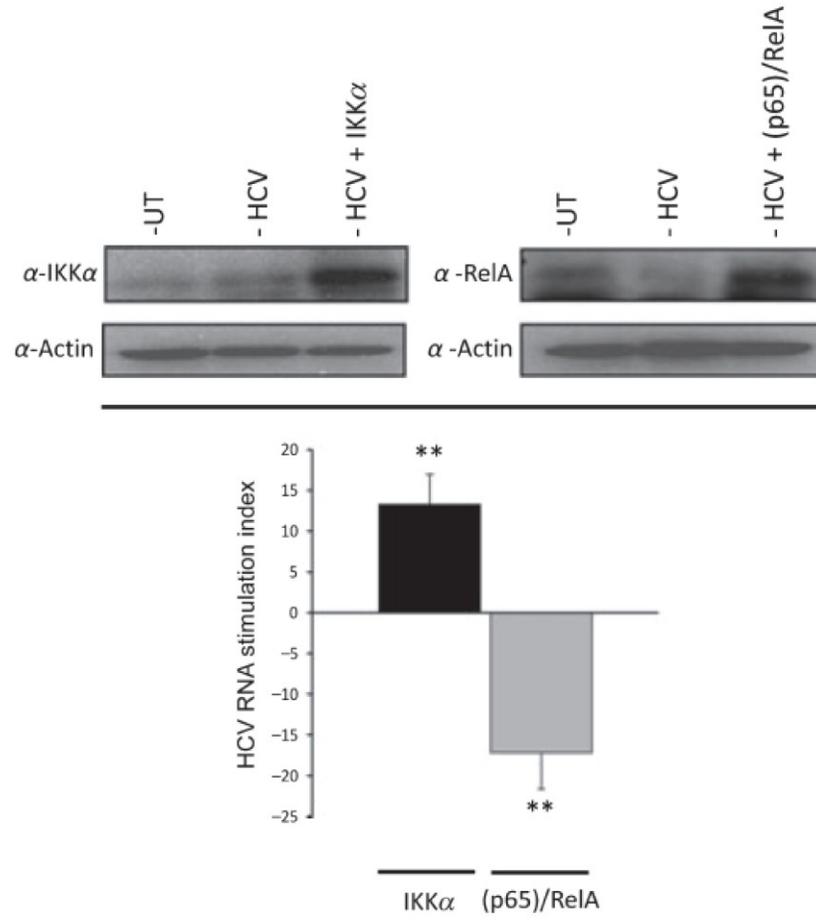


Figure 5.5

Rance *et al.*, Figure 5.

Chapitre 6 : Discussion

I. LES STRUCTURES ARN ET LEUR FONCTION AU SEIN DU GÉNOME DU VHC

Les deux premiers articles présentés dans ma thèse m'ont permis d'étudier des structures secondaires et tertiaires du génome du VHC, et de démontrer l'importance de certaines d'entre elles dans le cycle de réplication viral.

1. Les régions ARN simple brin et double brin du 3'UTR

Une bonne visualisation des structures ARN présentes *in vivo* dans le 3'UTR du génome du VHC est cruciale pour élucider les mécanismes de la réplication virale. Un grand nombre d'études visant à résoudre les structures ARN du 3'UTR ont été réalisées avec un fragment subgénomique. Ce fragment ARN représente uniquement la séquence du 3'UTR du génome. Dans ce contexte, ces études n'ont pas pu prendre en compte les interactions distales ARN-ARN entre le 3'UTR et des séquences présentes en dehors de cette région du génome [382, 383, 410]. De plus, les structures mises en évidence dans ces études ont rarement été obtenues dans des conditions biologiques [320-323].

Dans le premier article de ma thèse, nous avons réalisé une étude structurale *in situ* du 3'UTR du VHC dans un contexte de génome entier. Nous avons pu y dévoiler des caractéristiques structurales encore inconnues à ce jour.

La région 3'X

Les données que nous avons obtenues *in vitro* et *in situ*, avec le fragment subgénomique du 3'UTR, ont confirmé que le 3'X possède des structures ARN db [321, 326]. Cependant, les premières expériences que nous avons réalisées *in situ* avec le génome du VHC ne nous

permettaient pas de déterminer la présence de structures dans le 3'X. Le génome du VHC que nous avons utilisé, est capable de produire les protéines virales notamment celles présentes dans le complexe de réplication viral (NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Ne pouvant observer des structures dans la région 3'X et sachant que celles-ci sont cruciales pour la synthèse de l'ARN viral [271], nous avons émis l'hypothèse que les protéines virales associées à des facteurs cellulaires formaient un gros complexe protéique au niveau du 3'X empêchant le psoralène d'atteindre le génome viral. En effet, Wellinger et al. ont montré que le psoralène, agent chimique que nous avons utilisé pour dévoiler les structures ARN db, ne peut pas atteindre le double brin d'ADN nucléosomal dans la chromatine lorsque ce dernier est protégé par les octamères d'histones [427]. De la même façon le complexe de réplication viral pourrait bloquer l'action du psoralène au niveau du 3'X. Nous avons donc recommencé les études structurales du 3'X avec un génome du VHC muté qui n'exprime pas les protéines non structurales NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. Grâce à ce mutant particulier nous avons montré que le 3'X du génome du VHC est formé de structures ARN db accessibles par le psoralène quand les protéines virales étaient absentes. Ceci nous a amené à privilégier un modèle selon lequel le 3'X est formé de structures ARN db. Les protéines non structurales virales nécessaires à la réplication du virus seraient plus intimement liées au 3'UTR que les protéines cellulaires capables de se lier à cette région du génome [109, 153, 331, 428].

Un autre modèle pourrait émerger des résultats que nous avons obtenus. Il est possible que la structure du 3'X soit très dynamique au cours de la synthèse de l'ARN viral. Cette région du génome pourrait former des structures ARN db lors de l'initiation de la réplication. En effet, il a été montré que la structure tige-boucle SL1 du 3'X est essentielle pour la réplication de l'ARN viral et notamment lors de l'initiation [271, 342]. Ces structures seraient ensuite déroulées par l'hélicase NS3 [146, 334] permettant la poursuite de la synthèse de

l'ARN(-) par la polymérase NS5B. Nous avons réalisé nos expériences 12h après la transfection du génome. Il est possible qu'à ce moment, la région ARN du 3'X soit déroulée et donc sous forme d'ARN sb. Dans ce cas, l'ARN sb n'est pas reconnu par le psoralène. L'utilisation du génome mutant n'exprimant pas les protéines virales du complexe de réplication confirmerait ces résultats en dévoilant des structures ARN db au niveau du 3'X. Ainsi, en l'absence des protéines virales, la synthèse de l'ARN du VHC n'a pas lieu et la structure du 3'X serait sous forme d'ARN db c'est-à-dire à l'état d'initiation de la réplication.

Nous avons favorisé le premier modèle à cause des résultats obtenus avec le DMS. En effet, lors des premières expériences, la réactivité du DMS, agent chimique qui reconnaît les ribonucléotides non appariés, a aussi été stoppée au niveau du 3'X. Cela indique qu'aucune zone d'ARN sb n'a été détectée [429].

Le domaine poly(U/UC)

Les résultats obtenus *in vitro* et *in situ* avec le fragment subgénomique suggèrent que la région poly(U/UC) du 3'UTR adopte une structure ouverte avec une zone ARN sb dépourvue de structures ARN db, ce qui concorde avec les études précédentes [321, 322, 324]. Étonnamment, lorsque nous avons effectué les analyses structurales *in situ* avec le génome entier du VHC, nous avons observé la présence de structures ARN db au niveau de la séquence poly(U/UC). Cette observation suggère que la région poly(U/UC) est impliquée dans une interaction ARN-ARN avec une séquence située en dehors du 3'UTR. Bien que la séquence VR et le domaine poly(U/UC) ne soient pas considérés comme essentiels pour l'initiation de la synthèse de l'ARN du VHC, il a été montré que la région poly(U/UC) confère un avantage répliatif au virus chez les chimpanzés infectés [140, 352, 353, 355, 356]. Il est donc possible

que l'importance de ce domaine lors du cycle de réplication viral soit due à une interaction distale entre cette séquence et une autre présente en amont dans le génome.

Une analyse bioinformatique de la séquence VR-poly(U/UC) nous a permis d'identifier une séquence complémentaire dans la région codante pour NS5B. Ainsi nous supposons que le motif ARN db identifié au niveau de la séquence VR-poly(U/UC) est dû à l'interaction ARN-ARN entre ces deux séquences. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Par une technique appelée « *binding assay* », il serait intéressant d'étudier *in vitro* si ces deux séquences peuvent interagir. Nous pourrions aussi construire un génome du VHC muté au niveau des séquences d'intérêt et réaliser les analyses structurales afin d'étudier si des changements apparaissent.

Il est aussi possible que la séquence poly(U/UC) soit impliquée dans une interaction avec une séquence encore plus éloignée dans le génome. Cette association pourrait en outre être médiée ou stabilisée par des facteurs protéiques cellulaires et/ou viraux [153]. En effet, en 2011, Wang et al. ont prouvé que la protéine cellulaire PCBP2 interagit à la fois avec le 5'UTR et le 3'UTR du VHC pour former un complexe ARN-protéine et permettre une interaction entre ces deux extrémités du génome viral [414, 416]. Il est possible que la région poly(U/UC) soit impliquée dans cette interaction. Si cette protéine est un facteur clé dans la formation de la structure ARN db détectée dans le poly(U/UC), des expériences structurales dans lesquelles l'expression de cette protéine serait abolie par des siRNA pourraient confirmer cette hypothèse.

2. La fonction des structures tertiaires du génome du VHC induites par des interactions intramoléculaires

Dans le génome du VHC, des éléments structurels ayant un rôle dans le cycle viral sont présents au niveau des extrémités 5' et 3'. Le 5' est principalement impliqué dans la traduction virale alors que le 3' joue essentiellement un rôle dans la synthèse de l'ARN viral (comme les structures du 3'UTR). Toutefois, certaines structures présentes au sein de ces deux extrémités du génome ont un double rôle en régulant à la fois la traduction et la réplication de l'ARN viral. Ces données ont permis d'émettre l'hypothèse que différentes conformations du génome du VHC, incluant la circularisation de ce dernier, pourraient réguler la progression du cycle de réplication du virus et cela grâce à des « interrupteurs moléculaires ». Une étude bio-informatique en 2004 [372], avait prédit différentes interactions intramoléculaires distales au sein du génome du VHC. L'une d'entre elles nous a interpellés car elle impliquait les extrémités 5' et 3' du génome. Ainsi, dans le deuxième article de ma thèse, nous avons décidé de démontrer l'existence et l'importance de cette interaction ARN-ARN distale qui suggère une circularisation du génome du VHC.

Dans cet article, nous avons prouvé dans un premier temps, l'existence de l'interaction ARN-ARN entre les deux séquences présentes aux extrémités du génome, à savoir le 5'UTR (nt 1 à 290) et la séquence entre les nucléotides 8374 et 8676 de la région codante de la polymérase NS5B. En effet, nous avons montré *in vitro* la formation d'un complexe ARN-ARN entre ces séquences. La liaison entre les deux molécules d'ARN se fait avec une haute affinité et de façon dose dépendante. *In vitro*, ce complexe est stable à de faibles concentrations en magnésium et, surtout, ne nécessite pas la présence de protéines. Nous avons ensuite, grâce à des analyses bioinformatiques et mutationnelles, fourni la preuve que l'appariement de bases entre la séquence du 5'UTR (nt 1-290) et celle de NS5B (nt 8374-8676) a lieu au niveau des

nucléotides 95 à 110 dans le 5'UTR et des nucléotides 8528 à 8543 dans la séquence codante de NS5B. Ce résultat vient appuyer les prédictions de Thurner et al. [372]. En outre nous avons constaté que le duplex formé par les deux molécules d'ARN, est composé de deux types d'appariement de bases. Nous avons noté la présence d'un appariement canonique de type Watson-Crick et d'un appariement de type « *wobble* ». Nos résultats ont montré que l'appariement canonique Watson-Crick est nécessaire et suffisant pour que l'interaction ARN-ARN se fasse. Les appariements de type « *wobble* » ont la particularité d'être retrouvés au niveau des structures secondaires des ARN comme dans les ARN de transfert cellulaires [430]. Cet appariement de bases pourrait être ainsi impliqué dans la stabilisation du duplex ARN dont on a prouvé l'existence et nommé « 5'UTR(nt 95-110)-NS5B(nt 8528-8543) ».

Les résultats obtenus *in vitro* nous ont fourni la preuve que les extrémités ARN du génome du VHC interagissent. Nous avons ensuite déterminé l'importance de cette interaction intramoléculaire distale sur le cycle viral. Les données obtenues ont démontré que cette interaction joue un rôle important dans le cycle de réplication du VHC. En effet, la quantité intracellulaire de l'ARN viral diminue de 5 à 8 fois lorsque l'interaction distale est déstabilisée, ce qui indique que cet appariement de bases est important pour la synthèse du génome viral. C'est un phénomène qui a été observé chez le virus de la dengue, un autre membre de la famille des *Flaviviridae*. En effet, Alvarez et al. ont montré que deux paires de séquences inverses complémentaires présentes aux extrémités du génome de ce virus interagissent et influencent la réplication du génome viral [402, 404]. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la conformation du génome du VHC induite par cette interaction intramoléculaire puisse influencer sur la stabilité de l'ARN viral, tel que suggéré par Villordo et al. en ce qui concerne le génome du virus de la dengue [431]. La baisse d'affinité dans la liaison entre les séquences du 5'UTR (nt 95-110) et de NS5B (nt 8528-8543), affecte également la production de virus

infectieux avec une diminution de 4 à 10 fois. Ceci peut être une conséquence directe de la diminution de la quantité d'ARN viral intracellulaire ou pourrait aussi être expliqué par la perte d'un motif ARN servant de signal d'encapsulation du génome viral [432]. Des génomes mutants permettant de rétablir la complémentarité entre les séquences d'intérêt, et donc, de restaurer l'affinité de la liaison ARN-ARN, ont des niveaux d'ARN viral intracellulaire et de production de virus infectieux comparables au génome du VHC WT. Ceci vient confirmer l'influence de l'interaction intramoléculaire distale, sur le cycle de réplication du VHC.

À notre connaissance, il s'agit du premier article démontrant qu'une interaction ARN-ARN distale entre les extrémités du génome du VHC peut influencer la réplication de l'ARN viral. Cette interaction met en jeu des séquences présentes dans le 5'UTR et la séquence codante de NS5B. Il fut démontré auparavant que l'extrémité 3' de la séquence nucléotidique de NS5B affecte à la fois la traduction virale [381] et la réplication du génome [377]. Cependant, il existe très peu de données expérimentales sur le reste de la séquence de NS5B [372]. Dans ce deuxième article, pour la première fois, nous avons caractérisé et démontré l'importance d'une séquence de la région codante de NS5B qui n'avait jamais été étudiée *in vitro* et *in vivo*. De plus, dans l'interaction ARN-ARN distale que nous avons étudiée, la région du 5'UTR impliquée est le domaine II. Il a été montré que ce domaine a un rôle important dans la traduction du VHC [298] mais également dans la synthèse de l'ARN viral [388]. Les résultats que nous avons obtenus pourraient ainsi expliquer le mécanisme par lequel ce domaine influence la réplication de l'ARN viral.

Une équipe en 2009 et 2012 a rapporté qu'une interaction ARN-ARN distale au sein du génome du VHC, lui conférant une conformation circulaire probable, a une forte influence sur l'activité IRES du virus [381, 382]. Nos résultats ont démontré qu'une autre interaction ARN-

ARN distale, n'impliquant pas les mêmes séquences mais suggérant aussi une circularisation du génome, joue un rôle important dans la synthèse du génome viral. Il est possible qu'au cours de la progression du cycle viral, le génome du VHC acquiert différentes conformations. C'est un phénomène qui a été observé chez le virus de la dengue. En effet, récemment il a été montré que le génome de ce virus est un ARN dynamique qui présente différentes conformations durant le cycle de réplication, et l'équilibre existant entre les formes circulaire et linéaire du génome est essentiel pour la réplication et l'infectivité virale [431].

En 2012, Shetty et al ont proposé un modèle dynamique de changement de conformations du génome du VHC au cours du cycle de réplication viral, dans lequel deux interrupteurs moléculaires 5BSL3.2 et SL2 du 3'X jouent un rôle essentiel [378]. Ils proposent que lors de la traduction de la polyprotéine virale la boucle interne de la structure 5BSL3.2 interagit d'abord avec le domaine IIIId de l'IRES du 5'UTR, entraînant la circularisation du génome et rapprochant du même fait le 5'UTR à proximité du 3'UTR. Les auteurs supposent qu'à ce moment là des protéines cellulaires forment un « pont » protéique qui stabilise la circularisation du génome. En effet, plusieurs protéines cellulaires telles que PTB [365, 412, 414], PCBP2 [416] et la protéine La [433] ont été caractérisées comme facteurs cellulaires se liant au 5'UTR et au 3'UTR du génome du VHC. Elles pourraient ainsi, comme supposé dans le modèle, intervenir dans la stabilisation de structures secondaires et tertiaires du génome afin de réguler le cycle de réplication viral. Une fois ce pont formé, le domaine IIIId de l'IRES serait libéré pour que le ribosome puisse interagir avec l'IRES afin d'initier la traduction virale. Cette conformation du génome est aussi appuyée par les observations de Romero-Lopez et al. qui ont montré que le repliement de l'IRES est influencé par l'extrémité 3' du génome [387]. La synthèse de la polyprotéine ainsi induite permet l'accumulation des différentes protéines virales notamment la protéase NS3/4 qui de façon comparable à ce qui est observé chez le poliovirus

[434] cliverait le « pont » protéique menant au basculement de la forme circulaire du génome vers une forme linéaire. Shetty et al. proposent ensuite, qu'au niveau du 3' du génome, des interactions entre la boucle apicale de 5BSL3.2 et SL2 du 3'X, entre la boucle interne de 5BSL3.2 et la séquence 200 nt en amont, serviraient de plateforme pour l'ARN polymérase ARN dépendante lors de la réplication de l'ARN viral [378]. A cette étape du cycle viral, nos résultats peuvent venir compléter le modèle proposé. En effet, on peut imaginer que comme suggéré par Shetty et al., les interactions en 3' du génome sont très importantes au début de la synthèse de l'ARN viral. Puis une forme circulaire du génome viral induite par l'interaction du domaine II du 5'UTR et la séquence des nucléotides 8528 à 8543 de NS5B permettrait d'avoir une réplication de l'ARN viral plus efficace. Cette efficacité pourrait être due à un phénomène de recyclage de NS5B permettant la synthèse rapide de molécules ARN(-). En effet, la proximité spatiale des extrémités 5' et 3' du génome permettrait à la polymérase virale de ne pas se dissocier de l'ARN génomique du VHC rendant la synthèse plus efficace. Cela pourrait ressembler au modèle proposé pour le recyclage du ribosome lors de la traduction des ARNm [435]. Enfin, pour finir le cycle viral, les auteurs ajoutent que l'accumulation du génome viral entraînerait la dimérisation de ce dernier au niveau de la séquence de SL2, inhibant la synthèse de l'ARN viral et permettant au cycle viral de basculer vers le processus d'assemblage du VHC [208, 357, 378] (annexe II).

Ainsi, les différentes conformations du génome du VHC peu à peu dévoilées par les différentes études sur les interactions ARN-ARN intramoléculaires au sein du génome du VHC, permettent de mettre en évidence l'existence et le rôle d'interrupteurs moléculaires permettant la progression du cycle viral. Ces différents mécanismes de régulation permettraient en partie de répondre à des questions importantes laissées en suspens sur le cycle de réplication du VHC.

II. MÉTHODES D'ANALYSE DES STRUCTURES ARN DU GÉNOME DU VHC

Plusieurs méthodes ont été développées pour dévoiler l'existence des structures secondaires dans des ARN cellulaires et viraux *in vitro*. En effet, des méthodes purement physiques ont été utilisées pour visualiser ces structures. On retrouve la cristallographie par rayon X [304], ou la spectroscopie par RMN (résonance magnétique nucléaire) [306]. Les structures ARN du génome du VHC ont aussi été étudiées *in vitro* en analysant l'accessibilité de l'ARN grâce à des oligonucléotides [391]. Une de ces méthodes a été réalisée avec des puces ADN aussi appelées « *DNA-microarray* ». Cette technique est basée sur l'hybridation de fragments subgénomiques du VHC avec des oligonucléotides ADN complémentaires, présents sur une puce ADN [387, 436]. Cependant les outils actuels utilisés permettant l'étude des structures ARN dans des conditions biologiques sont limités.

1. Analyses chimiques des structures ARN

En étudiant les structures du 3'UTR, nous avons développé une méthode qui a permis de localiser, dans des conditions biologiques, des régions ARN db et ARN sb au sein du génome du VHC. Nous avons utilisé deux agents chimiques, le psoralène (*aminomethyltrioxsalen*) et le DMS, qui reconnaissent respectivement les régions ARN db et ARN sb. Les résultats obtenus avec ces deux agents chimiques, fonctionnellement différents, nous ont permis de collecter des données complémentaires.

Le psoralène est une molécule cyclique qui interagit principalement avec les pyrimidines. Il a la capacité de pénétrer dans les cellules vivantes et de venir s'intercaler au

niveau de nucléotides appariés notamment au niveau des régions ARN db. Un traitement aux UV permet par la suite de former une liaison covalente au niveau des bases appariées tout en préservant les structures ARN et leurs interactions avec les protéines [437, 438].

Le DMS est un composant chimique qui méthyle principalement les adénosines et les cytosines [439, 440], mais aussi plus rarement les guanines [441]. Le DMS modifie les nucléotides non appariés dans les régions d'ARN sb et comme le psoralène, il entre dans les cellules vivantes [429]. La liaison covalente induite par le traitement du psoralène associé aux UV (aussi appelée « *crosslinking* ») au niveau des régions d'ARN db et les méthylation dues au DMS sur les régions d'ARN sb, sont ensuite détectées par RT-PCR. La RT-PCR permet de générer des sondes qui seront ensuite hybridées sur des membranes contenant la séquence ADN du 3'UTR. Les modifications, obtenues après traitement avec le DMS ou Psoralène/UV, au sein de l'ARN provoquent l'arrêt de la transcriptase inverse et la formation de transcrits abortifs. Ceci entraîne la perte des sondes et une diminution de l'intensité du signal au niveau des bandes du Southern-blot (annexe I).

La particularité et la force de notre méthode est qu'elle permet d'identifier des structures secondaires présentes sur un substrat ARN replié dans son état natif, complexé à des protéines et donc dans des conditions biologiques. Cette approche diffère à plusieurs égards des méthodologies actuellement utilisées [442]. En premier lieu, cette méthode peut être utilisée à la fois *in vivo* et *in vitro*. En effet, à la fois le psoralène et le DMS pénètrent librement dans les cellules afin de reconnaître et de modifier les nucléotides ciblés. Au contraire, la plupart des études utilisant la méthode SHAPE, qui est la technique la plus utilisée à l'heure actuelle, réalisent des expériences sur la structure de l'ARN *in vitro*, supposant que l'ARN a un repliement identique *in vivo* et *in vitro*. Dans notre méthode nous utilisons deux agents modificateurs permettant d'obtenir des données complémentaires et conduisant à l'identification

de structures secondaires d'ARN qui ne seraient pas reconnues lors de l'utilisation d'un seul agent. En effet, grâce à cette méthode, nous avons pu mettre en évidence la présence d'une interaction distale au sein du génome du VHC, impliquant notamment le domaine poly(U/UC) du 3'UTR. Au contraire, dans la technique SHAPE, des agents comme le NMIA et le 1M7 reconnaissent et modifient uniquement les nucléotides non appariés et donc les régions ARN sb [443].

Les résultats obtenus avec notre méthode informent sur la présence de régions ARN sb et/ou ARN db sur des séquences de 100 à 300 nucléotides. Cela permet de donner une vision globale de l'accessibilité du domaine ARN étudié. Dans le but d'affiner ces premiers résultats à large spectre, il faudrait identifier les nucléotides impliqués dans les appariements d'ARN db. Pour cela, il serait avantageux de combiner les traitements au DMS et au psoralène/UV avec la technique d'extension d'amorces [380, 442]. L'analyse des résultats sur un gel polyacrylamide associé à des réactions de séquençage permettra d'identifier les nucléotides modifiés par le DMS ou les liaisons covalentes induites par le psoralène/UV [380]. Récemment, les techniques de séquençage à haut débit ont été associées aux méthodes de détection des structures ARN, ce qui permet d'avoir des résultats quantitatifs et d'analyser un grand nombre de molécules [444].

Dans la cellule, les séquences ARN sont étroitement liées aux protéines. Certaines sont impliquées dans la formation de structures secondaires ou stabilisent l'ARN avec lequel elles sont liées [445]. Ces protéines liées aux ARN sont importantes et les identifier permet de mieux comprendre les processus cellulaires ou viraux dans lesquels les structures ARN sont impliquées. Il existe des méthodes efficaces *in vitro* qui utilisent les UV pour détecter les liaisons entre une protéine et une séquence ARN sb [446]. Cependant ces techniques ne sont pas efficaces pour la détection des liaisons entre une protéine et une structure ARN db. Pour remédier à cela, en 2000, Liu et al. ont proposé d'utiliser le bleu de méthylène. Ce composé

s'intercale dans les molécules d'acides nucléiques double brin et l'ajout de lumière blanche permet par la suite la formation d'une liaison covalente entre la protéine et la structure ARN db [447].

Ainsi la méthode que nous avons développée pourrait être utilisée pour détecter la présence des régions ARN sb et ARN db dans de grands génomes viraux afin d'avoir une visualisation globale de l'accessibilité de la région ARN étudiée. Cette méthode pourrait être utilisée dans l'étude structurelle des petits ARN catalytiques, dont les subtiles modifications de conformation modifient radicalement leur état fonctionnel [448].

2. Analyses mutationnelles des structures ARN

L'analyse mutationnelle des structures ARN dans les génomes viraux ou sur les ARN cellulaires permet de mettre en évidence l'importance et la fonction de ces structures dans le cycle de réplication d'un virus ou dans un processus cellulaire, par exemple. En effet, grâce à des analyses mutationnelles, Yi et al. en 2003 ont démontré que la structure de la tige-boucle SL1 du 3'UTR est essentielle pour la réplication du génome du VHC [271].

De la même façon, nous avons démontré grâce à des analyses mutationnelles *in vitro* et *in vivo* qu'une structure tertiaire du génome du VHC, induite par une interaction intramoléculaire distale, a une grande importance dans le cycle de réplication du VHC. L'utilisation de séquences ARN mutées, associée à une technique *in vitro* de liaison ARN-ARN appelée « *binding assay* », a permis de démontrer l'existence de cette interaction. Nous avons utilisé deux molécules d'ARN d'environ 300 bases qui représentent les séquences cibles. Une des deux molécules a été marquée radioactivement puis mélangée avec des concentrations croissantes de la deuxième molécule. La réaction a ensuite été analysée sur gel polyacrylamide.

L'étude de ce gel nous a permis de déterminer la présence d'un complexe ARN-ARN et de déterminer l'affinité de la liaison entre les deux molécules d'ARN. De plus, des analyses bioinformatiques ont permis de prédire les nucléotides putatifs permettant la formation du complexe ARN-ARN, dévoilant des appariements de type Watson-Crick et de type « *wobble* ». Afin de déterminer quel type d'appariements est essentiel à l'interaction, nous avons réalisé des expériences de « *binding assay* » avec des séquences mutées. Les différents résultats obtenus ont démontré que la présence de mutations entraîne une diminution de l'affinité de la liaison ARN-ARN. Ainsi, les résultats associant une technique de liaison ARN-ARN *in vitro* et des séquences mutées ont mis en évidence que l'interaction ARN-ARN étudiée se fait d'une façon dose dépendante et en l'absence de protéines. De plus, cela a permis de démontrer que l'appariement Watson-Crick est nécessaire et suffisant pour la formation du complexe ARN-ARN.

Afin de montrer que cette interaction ARN-ARN distale joue un rôle dans le cycle viral, des génomes mutants du VHC au niveau des séquences d'intérêt ont été générés. De simples mutants ont été construits, soit dans la séquence du 5'UTR soit dans celle de la séquence codante de NS5B, ce qui entraîne une diminution de l'affinité lors de la formation du complexe ARN-ARN. Des doubles mutants, mutés à la fois dans les séquences du 5'UTR et de NS5B ont aussi été obtenus. Les mutations dans les séquences d'intérêt sont inverses complémentaires permettant de restaurer l'affinité du duplexe ARN-ARN. Les structures secondaires du 5'UTR des mutants n'ont pas été affectées par les mutations (logiciel m-fold). En outre, la séquence d'acides aminés n'a pas été modifiée par les mutations introduites dans la séquence codante de NS5B. Afin d'étudier l'influence de l'interaction ARN-ARN distale sur le cycle de réplication du VHC, trois étapes du cycle viral, à savoir la traduction du VHC, la synthèse de l'ARN viral et la production de virus infectieux ont été examinées en culture cellulaire.

Ainsi, nous avons pu montrer par des méthodes indirectes que, grâce à l'interaction ARN-ARN distale entre le domaine II du 5'UTR et une séquence nucléotidique dans NS5B, le génome du VHC pourrait se circulariser. Toutefois, il serait intéressant de visualiser physiquement ce génome sous forme circulaire, grâce à la microscopie électronique par exemple. Dans une étude sur le virus de la dengue, grâce à la microscopie électronique à force atomique, Alvarez et al. ont pu visualiser la circularisation de l'ARN génomique de ce virus [402]. De plus, en 2011, Wang et al. ont utilisé la microscopie électronique afin de mettre en évidence la présence d'une forme circulaire d'un génome tronqué du VHC. Cette conformation était induite par la présence de la protéine PCBP2 [416].

III. FACTEURS DE PERSISTANCE DU VHC

Certains virus peuvent persister dans la cellule hôte. Cette persistance est le résultat d'un échec de la réponse immune à éliminer le virus. Plusieurs caractéristiques du VHC ont un rôle dans l'échappement du virus aux réponses immunitaires. La dérégulation de certaines voies de signalisation antivirales par les protéines du VHC et les structures tertiaires hautement organisées du génome viral, en seraient deux exemples.

1. Les superstructures du génome du VHC

Des analyses bioinformatiques ont montré que la présence de structures ARN tertiaires hautement organisées (GORS) dans un génome viral, comme celui du VHC, est associée à la capacité des virus à persister [392]. Le mécanisme qui expliquerait cette corrélation n'est pas

connu, cependant il est supposé que ces structures tertiaires permettraient aux virus de contourner les mécanismes de défense immunitaire innée [391, 392]. Les structures ARN hautement organisées, qui comprennent les formes circularisées des génomes viraux, pourraient induire l'évasion du virus face aux défenses cellulaires. Ces structures du génome permettraient au virus d'échapper aux défenses innées en imitant les ARN structurés cellulaires tels que l'ARN de transfert. La conformation adoptée par le génome ne serait pas reconnue et pas accessible pour les protéines de liaison à l'ARN, comme PKR [449] ou RIG-1 [21, 450] qui sont couplées à des voies de signalisation antivirales telles que la voie de l'interféron [451]. Une autre hypothèse, avancée par Simmonds et al., est que les structures tertiaires des ARN fonctionneraient comme les ARN viraux qui inhibent l'activation de PKR en empêchant sa dimérisation [392, 452, 453].

Le génome du VHC contient des structures ARN secondaires et tertiaires qui ont d'abord été prédites par des analyses bioinformatiques [392]. Puis, depuis quelques années, des interactions distales au sein du génome dévoilant des structures ARN tertiaires ont été démontrées [356, 375, 379, 382]. Dans le deuxième article de ma thèse, nous avons aussi apporté de nouvelles informations sur les structures de l'ARN viral en démontrant l'existence d'une interaction intramoléculaire distale entre le domaine II du 5'UTR et la séquence des nucléotides 8528 à 8543 de NS5B. Ainsi, les structures tertiaires hautement organisées présentes dans le génome du VHC pourraient non seulement jouer un rôle dans le cycle de réplication viral mais aussi permettraient au virus de déjouer l'immunité innée de la cellule.

2. Contrôle de la réponse immunitaire innée

La persistance du VHC est en partie liée à l'incapacité de l'immunité innée à maintenir la pression antivirale et donc d'éliminer les cellules infectées. L'interaction que le virus entretient avec son hôte y joue un rôle important. Les propriétés virologiques du VHC ainsi que sa capacité immuno-modulatrices permettent au virus d'échapper à la réponse antivirale et de persister dans la cellule infectée. Dans le troisième et dernier article de ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une molécule immuno-modulatrice, la thalidomide, sur le cycle de réplication du VHC. Le choix d'étudier cette molécule a été fait car cette dernière est utilisée pour atténuer la fibrose hépatique [454]. Or, cette maladie est une manifestation majeure de l'infection par le VHC et l'influence de la thalidomide sur le virus n'était pas connue.

Dans le troisième article de ma thèse, nous avons montré qu'en présence d'une concentration croissante de thalidomide, le taux d'ARN répliatif viral augmente dans les cellules infectées par le VHC. Des études précédentes avaient montré que la thalidomide inhibe l'activité de NF- κ B en bloquant la phosphorylation de la kinase IKK [418, 455]. Nous avons donc émis l'hypothèse que la thalidomide pourrait activer la réplication du VHC dans les cellules infectées en inhibant la voie de signalisation de NF- κ B. L'utilisation d'inhibiteurs de cette voie de signalisation qui miment les actions de la thalidomide, a permis de démontrer que l'inhibition d'IKK augmente la réplication de l'ARN du VHC. De plus, afin d'étayer cette hypothèse, nous avons montré que la surexpression d'IKK α , qui augmente la forme inactive d'IKK, mène à une augmentation de la réplication du VHC. Inversement la surexpression de la sous-unité RelA, qui augmente les formes libres de NF- κ B dans la cellule, entraîne une diminution du taux d'ARN viral. Ces résultats indiquent que le complexe IKK a un rôle central dans le contrôle de la réplication du VHC.

Ils suggèrent aussi que le blocage d'IKK, et par conséquent l'inhibition de l'activité de NF- κ B par la thalidomide, pourrait activer la réplication du virus chez des patients traités [456, 457].

Le mécanisme exact expliquant ces résultats n'est pas connu. Toutefois, on peut penser que la thalidomide agirait en synergie avec les protéines du VHC, bloquant ainsi certaines voies antivirales pour échapper aux réponses immunitaires. Dans la cellule, à la fois NF- κ B et IRF-3 jouent un rôle essentiel dans la réponse antivirale face à l'infection du VHC, en exprimant respectivement des cytokines antivirales et l'IFN- β . L'activation de ces deux acteurs clefs [458, 459] commence par la reconnaissance de l'ARN viral par le TLR3 [458]. Une fois ce récepteur activé, une cascade d'évènements mène à la phosphorylation/activation du complexe IKK [460]. Ce complexe phosphoryle à son tour κ B menant à la dégradation de ce dernier et à la libération de NF- κ B. Cet évènement permet ensuite la production de cytokines antivirales. Or, il a été montré que la protéine NS5B du VHC inhibe en partie la voie de signalisation de NF- κ B en bloquant IKK [461]. L'action de la thalidomide viendrait ajouter un effet inhibiteur à celui provoqué par NS5B. Pour être activée, la protéine IRF-3 est phosphorylée puis dimérisée. La phosphorylation est principalement faite par les kinases IKKi et TBK1. Cependant IKK peut aussi jouer un rôle dans cette activation [462]. La thalidomide, ici encore, accentuerait l'effet inhibiteur de la protéase virale NS3/4 connue pour inhiber la voie de signalisation d'IRF-3. La thalidomide agirait donc en synergie avec les protéines virales afin de bloquer la signalisation antivirale.

Nous avons ainsi démontré que la thalidomide active la réplication du VHC *in vitro* en inhibant un acteur clef de la voie de signalisation antivirale. Elle pourrait agir en synergie avec les protéines virales du VHC, afin que ce dernier échappe à la réponse antivirale et puisse persister dans la cellule. Ces résultats sont aussi à prendre en considération dans l'établissement d'un traitement contre la fibrose hépatique induite par le VHC.

IV. STRATÉGIES ANTIVIRALES CONTRE LE VHC

Le traitement utilisé contre le virus de l'hépatite C, à base d'IFN- α , a été amélioré mais l'efficacité de ce dernier est dépendante du génotype du virus et des mutants de résistance apparaissent. De plus, ce traitement est coûteux, long, avec de gros effets secondaires. Ainsi le développement de nouveaux antiviraux est nécessaire.

1. Les oligonucléotides antiviraux

Le développement d'oligonucléotides antiviraux ciblant le génome du VHC fait partie de l'une des pistes de recherche dans la lutte contre l'hépatite C. Comme le cycle de réplication de ce virus ne comporte aucun intermédiaire ADN, la perturbation ou la destruction ciblée de l'ARN génomique pourrait éliminer le virus de la cellule. Pour cette raison, l'ARN du VHC est devenu une cible principale pour les nouvelles plateformes antivirales, tels que les oligonucléotides [463].

Le plus important avec ces molécules est de cibler les séquences conservées du génome afin d'avoir un effet à spectre large entre les différents génotypes du VHC. À la fois l'IRES du 5'UTR et le 3'UTR ont été des cibles privilégiées. En effet, l'IRES du VHC est très conservé parmi les différents génotypes viraux. Cette région hautement structurée est essentielle pour la traduction du VHC. Ainsi, ce domaine a souvent été pris pour cible pour le développement de nouveaux inhibiteurs. Des stratégies telles que les ARN antisens [464], les aptamères [465], les ribozymes [466] ou les ARN interférents [467-469] ont été mises en place pour inhiber la traduction. Le 3'UTR est aussi une séquence très conservée dans le génome du VHC. Cette région du génome est très importante pour la synthèse de l'ARN viral. Ainsi, le 3'UTR a aussi été une cible importante pour développer des oligonucléotides antiviraux. Or, très peu de molécules ayant un effet sur la réplication du VHC ont été rapportées [469, 470]. La principale explication viendrait de la faible accessibilité de cette région du génome notamment du 3'X.

Toutes les molécules développées à ce jour n'ont pas fait la preuve de leur efficacité *in vivo*, malgré leur puissance antivirale *in vitro* [471]. En effet, cette constatation est principalement due aux problèmes de livraison de ces molécules au site d'infection *in vivo*. De plus, un grand nombre de molécules ciblant le 5'UTR ou le 3'UTR n'ont jamais été rapportées car ces régions hautement structurées sont souvent inaccessibles aux oligonucléotides. Ainsi, de nouvelles approches ciblant d'autres parties du génome seraient à considérer. Les séquences permettant au génome d'adopter des structures tertiaires essentielles au cycle de réplication viral, pourraient constituer de nouvelles cibles antivirales. Nous avons démontré que l'interaction intramoléculaire distale entre le domaine II du 5'UTR et la séquence des nucléotides 8528 à 8543 de NS5B, influence la réplication de l'ARN du VHC. Or, une analyse bioinformatique a montré que les séquences mises en jeu dans l'interaction sont conservées parmi les sept grands génotypes du VHC [100], avec 90% d'identité pour la séquence du 5'UTR

et 70% d'identité pour la séquence présente dans NS5B. Cette conservation de séquence et l'importance de l'interaction distale, nous font penser que les séquences présentes dans le 5'UTR et dans la séquence codante de NS5B devraient être prises en considération dans le développement de nouveaux antiviraux. Celle de NS5B plus particulièrement car elle semble peu structurée comparé au 5'UTR et donc plus accessible. Cette stratégie de déstabilisation des structures tertiaires du génome a commencé à être appliquée. En effet, une étude en février 2013 a montré que l'utilisation d'aptamères ciblant un acteur clef de plusieurs interactions intramoléculaires dans le génome du VHC, a permis d'inhiber la réplication de l'ARN viral [472].

2. La régulation de la voie antivirale NF-κB

Certaines stratégies antivirales ciblent la régulation des voies de signalisation de l'immunité. Nous avons observé dans le troisième article de ma thèse que le facteur de transcription NF-κB est un acteur clef dans le contrôle de la réplication du VHC. Perturber la régulation de cette voie de signalisation en l'inhibant est profitable pour le VHC.

Dans cette étude nous avons observé que la présence du VHC dans les cellules entraînait une diminution de l'expression de NF-κB/RelA. D'autres études avaient montré que l'activité de NF-κB est réduite dans les hépatocytes infectés [473]. De plus, nous avons observé que la surexpression de la protéine RelA diminue le taux d'ARN du VHC suggérant que cette protéine a un rôle crucial dans l'inhibition de la réplication virale. Une étude récente a démontré que la protéine RelA est importante pour l'initiation de l'expression de l'IFN-β et du même fait dans l'inhibition de la réplication virale quand l'activité d'IRF-3 est faible [474]. Or le niveau de la protéine IRF-3 est bas pendant la réplication du VHC à cause de la protéase

virale NS3/4. L'ensemble de ces données nous permettent de supposer qu'une surexpression de la protéine RelA pourrait mettre en échec la perte du signal IRF-3 et par conséquent bloquer la réplication du VHC.

Ainsi, activer la voie de signalisation de NF- κ B permettrait de contrôler la réplication du VHC. Cette régulation représente une alternative antivirale pour lutter contre l'infection au VHC. Cependant, NF- κ B est une protéine cellulaire qui est impliquée dans plusieurs processus cellulaires [475]. Interférer dans la régulation de cette protéine pourrait induire des effets non désirés. Par exemple, la dérégulation de la voie de signalisation de NF- κ B entraînant une activation continue de cette protéine est la cause de nombreuses maladies comme les maladies inflammatoires [476] et le syndrome de détresse respiratoire [477].

Conclusion

Dans le laboratoire, au cours de mon doctorat, nous nous sommes intéressés à différents facteurs influençant le cycle de réplication du VHC. L'impact des structures ARN du génome sur le cycle viral du VHC a été le principal sujet de ma thèse.

Dans un premier temps, les résultats que nous avons obtenus sur la structure du 3'UTR ont permis d'améliorer nos connaissances sur les dynamiques structurelles qui se produisent dans le génome du VHC lors de la synthèse de l'ARN viral. Grâce à notre méthode employant le psoralène/UV et le DMS, nous avons notamment démontré pour la première fois que le domaine poly(U/UC) du génome viral est impliqué dans une interaction ARN-ARN avec une séquence du génome localisée en dehors du 3'UTR. Les différences dans les conclusions obtenues *in vitro* et *in vivo* renforcent l'importance d'effectuer les analyses structurelles des grands ARN *in situ* plutôt qu'*in vitro* avec l'ARN entier au lieu de fragments subgénomiques. En outre, la méthodologie présentée dans l'étude du 3'UTR, permettant d'identifier les régions à ARN sb ou les structures ARN db, constitue un nouvel outil précieux qui devrait améliorer la prédiction de la structure secondaire et tertiaire des ARN cellulaires et viraux.

Dans un second temps, nous avons démontré par une analyse mutationnelle, l'existence d'une nouvelle interaction ARN-ARN distale impliquant la région codante de la polymérase virale NS5B (nt 8528-8543) et le domaine II du 5'UTR (nt 95-110). Nous avons montré pour la première fois, qu'une interaction ARN-ARN impliquant les extrémités du génome du VHC a un rôle important dans la synthèse de l'ARN viral ou dans la stabilité de ce dernier. En effet, les résultats obtenus indiquent que cette interaction ARN-ARN est essentielle pour que la réplication du VHC soit efficace. Cela renforce la thèse selon laquelle le génome du VHC peut

adopter une conformation circulaire afin de réguler la progression de son cycle de réplication viral.

Dans le troisième article de ma thèse, nous nous sommes intéressés à un autre facteur influençant le cycle de réplication du VHC : la régulation des défenses antivirales. Dans ce contexte, nous avons étudié l'influence d'une molécule immuno-modulatrice, la thalidomide, sur la réplication du VHC. Cette molécule est utilisée pour atténuer la fibrose hépatique, manifestation majeure de l'infection par le VHC. Cependant, l'influence de la thalidomide sur le cycle viral du VHC n'était pas connue. Ainsi, l'étude que nous avons menée a montré qu'en présence d'une concentration croissante de thalidomide, le taux d'ARN répliatif viral augmente dans les cellules infectées par le VHC. Nous avons démontré par la suite que la thalidomide active la réplication du VHC dans les cellules infectées en inhibant la voie de signalisation de NF- κ B. Cette molécule pourrait agir en synergie avec les protéines virales du VHC, afin que ce dernier échappe à la réponse antivirale et puisse persister dans la cellule. Les données que nous avons générées indiquent que la voie de signalisation de NF- κ B a un rôle central dans le contrôle de la réplication du VHC. Ainsi, les résultats obtenus dans cet article sont à prendre en considération dans l'établissement d'un traitement contre la fibrose hépatique induite par le VHC.

Références

1. Feinstone, S.M., A.Z. Kapikian, R.H. Purcell, H.J. Alter, and P.V. Holland, *Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B*. N Engl J Med, 1975. **292**(15): p. 767-770.
2. Alter, H.J., R.H. Purcell, P.V. Holland, and H. Popper, *Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis*. Lancet, 1978. **1**(8062): p. 459-463.
3. Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton, *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. **244**(4902): p. 359-362.
4. Houghton, M., *The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus*. J Hepatol, 2009. **51**(5): p. 939-948.
5. World Health Organization. *Hepatitis C facts sheet*. 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
6. Perz, J.F., G.L. Armstrong, L.A. Farrington, Y.J. Hutin, and B.P. Bell, *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide*. J Hepatol, 2006. **45**(4): p. 529-538.
7. Cornberg, M., H.A. Razavi, A. Alberti, E. Bernasconi, M. Buti, C. Cooper, . . . S. Zeuzem, *A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel*. Liver Int, 2011. **31 Suppl 2**: p. 30-60.
8. Averhoff, F.M., N. Glass, and D. Holtzman, *Global burden of hepatitis C: considerations for healthcare providers in the United States*. Clin Infect Dis, 2012. **55 Suppl 1**: p. S10-15.

9. Alter, M.J., *Epidemiology of hepatitis C virus infection*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2436-2441.
10. Sievert, W., I. Altraif, H.A. Razavi, A. Abdo, E.A. Ahmed, A. Alomair, . . . F. Negro, *A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt*. Liver Int, 2011. **31 Suppl 2**: p. 61-80.
11. Public Health Agency of Canada. *Hepatitis C in Canada: 2005-2010 Surveillance Report* in <http://www.phac-aspc.gc.ca/sti-its-surv-epi/hepc/surv-fra.php#note3>
12. McHutchison, J.G., *Understanding hepatitis C*. Am J Manag Care, 2004. **10**(2 Suppl): p. S21-29.
13. Blackard, J.T., M.T. Shata, N.J. Shire, and K.E. Sherman, *Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem*. Hepatology, 2008. **47**(1): p. 321-331.
14. Alter, H.J., *HCV natural history: the retrospective and prospective in perspective*. J Hepatol, 2005. **43**(4): p. 550-552.
15. Seeff, L.B., *The history of the "natural history" of hepatitis C (1968-2009)*. Liver Int, 2009. **29 Suppl 1**: p. 89-99.
16. Di Bisceglie, A.M., Z.D. Goodman, K.G. Ishak, J.H. Hoofnagle, J.J. Melpolder, and H.J. Alter, *Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis*. Hepatology, 1991. **14**(6): p. 969-974.
17. Kew, M.C., *Hepatitis viruses and hepatocellular carcinoma*. Res Virol, 1998. **149**(5): p. 257-262.

18. Frank, C., M.K. Mohamed, G.T. Strickland, D. Lavanchy, R.R. Arthur, L.S. Magder, . . . I. Sallam, *The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt*. Lancet, 2000. **355**(9207): p. 887-891.
19. Randall, R.E. and S. Goodbourn, *Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 1): p. 1-47.
20. Thimme, R., M. Binder, and R. Bartenschlager, *Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(3): p. 663-683.
21. Yoneyama, M. and T. Fujita, *RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 54-65.
22. Gale, M., Jr. and E.M. Foy, *Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 939-945.
23. Schoggins, J.W., S.J. Wilson, M. Panis, M.Y. Murphy, C.T. Jones, P. Bieniasz, and C.M. Rice, *A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 481-485.
24. Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and J. Tschopp, *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. Nature, 2005. **437**(7062): p. 1167-1172.
25. Li, K., E. Foy, J.C. Ferreon, M. Nakamura, A.C. Ferreon, M. Ikeda, . . . S.M. Lemon, *Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 2992-2997.

26. Ke, P.Y. and S.S. Chen, *Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro*. J Clin Invest, 2011. **121**(1): p. 37-56.
27. Bode, J.G., S. Ludwig, C. Ehrhardt, U. Albrecht, A. Erhardt, F. Schaper, . . . D. Haussinger, *IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3*. Faseb J, 2003. **17**(3): p. 488-490.
28. Gale, M.J., Jr., M.J. Korth, and M.G. Katze, *Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance*. Clin Diagn Virol, 1998. **10**(2-3): p. 157-162.
29. Amadei, B., S. Urbani, A. Cazaly, P. Fisicaro, A. Zerbini, P. Ahmed, . . . S.I. Khakoo, *Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus*. Gastroenterology, 2010. **138**(4): p. 1536-1545.
30. Sene, D., F. Levasseur, M. Abel, M. Lambert, X. Camous, C. Hernandez, . . . S. Caillat-Zucman, *Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines*. PLoS Pathog, 2010. **6**(11): p. e1001184.
31. Tseng, C.T. and G.R. Klimpel, *Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions*. J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 43-49.
32. Walker, C.M., *Adaptive immunity to the hepatitis C virus*. Adv Virus Res, 2010. **78**: p. 43-86.
33. von Hahn, T., J.C. Yoon, H. Alter, C.M. Rice, B. Rehermann, P. Balfe, and J.A. McKeating, *Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-*

- cell responses during chronic infection in vivo*. Gastroenterology, 2007. **132**(2): p. 667-678.
34. Logvinoff, C., M.E. Major, D. Oldach, S. Heyward, A. Talal, P. Balfe, . . . J.A. McKeating, *Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10149-10154.
35. Helle, F., A. Goffard, V. Morel, G. Duverlie, J. McKeating, Z.Y. Keck, . . . C. Voisset, *The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein*. J Virol, 2007. **81**(15): p. 8101-8111.
36. Brimacombe, C.L., J. Grove, L.W. Meredith, K. Hu, A.J. Syder, M.V. Flores, . . . J.A. McKeating, *Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission*. J Virol, 2011. **85**(1): p. 596-605.
37. Cox, A.L., T. Mosbruger, G.M. Lauer, D. Pardoll, D.L. Thomas, and S.C. Ray, *Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C*. Hepatology, 2005. **42**(1): p. 104-112.
38. Thimme, R., J. Bukh, H.C. Spangenberg, S. Wieland, J. Pemberton, C. Steiger, . . . F.V. Chisari, *Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15661-15668.
39. Gerlach, J.T., H.M. Diepolder, M.C. Jung, N.H. Gruener, W.W. Schraut, R. Zachoval, . . . G.R. Pape, *Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C*. Gastroenterology, 1999. **117**(4): p. 933-941.
40. Schulze zur Wiesch, J., G.M. Lauer, C.L. Day, A.Y. Kim, K. Ouchi, J.E. Duncan, . . . B.D. Walker, *Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously*

- controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes.* J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3603-3613.
41. Kaplan, D.E., K. Sugimoto, K. Newton, M.E. Valiga, F. Ikeda, A. Aytaman, . . . K.M. Chang, *Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C.* Gastroenterology, 2007. **132**(2): p. 654-666.
42. Jo, J., U. Aichele, N. Kersting, R. Klein, P. Aichele, E. Bisse, . . . R. Thimme, *Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model.* Gastroenterology, 2009. **136**(4): p. 1391-1401.
43. Neumann, A.U., N.P. Lam, H. Dahari, D.R. Gretch, T.E. Wiley, T.J. Layden, and A.S. Perelson, *Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy.* Science, 1998. **282**(5386): p. 103-107.
44. Soderholm, J., G. Ahlen, A. Kaul, L. Frelin, M. Alheim, C. Barnfield, . . . M. Sallberg, *Relation between viral fitness and immune escape within the hepatitis C virus protease.* Gut, 2006. **55**(2): p. 266-274.
45. Kimura, Y., T. Gushima, S. Rawale, P. Kaumaya, and C.M. Walker, *Escape mutations alter proteasome processing of major histocompatibility complex class I-restricted epitopes in persistent hepatitis C virus infection.* J Virol, 2005. **79**(8): p. 4870-4876.
46. Nakamoto, N., H. Cho, A. Shaked, K. Olthoff, M.E. Valiga, M. Kaminski, . . . K.M. Chang, *Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade.* PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000313.
47. Radziewicz, H., C.C. Ibegbu, H. Hon, M.K. Osborn, K. Obideen, M. Wehbi, . . . A. Grakoui, *Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8+ T cells undergo*

- massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection.* J Virol, 2008. **82**(20): p. 9808-9822.
48. Semmo, N., C.L. Day, S.M. Ward, M. Lucas, G. Harcourt, A. Loughry, and P. Klenerman, *Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection.* Hepatology, 2005. **41**(5): p. 1019-1028.
49. Strickland, G.T., S.S. El-Kamary, P. Klenerman, and A. Nicosia, *Hepatitis C vaccine: supply and demand.* Lancet Infect Dis, 2008. **8**(6): p. 379-386.
50. Fried, M.W., M.L. Shiffman, K.R. Reddy, C. Smith, G. Marinus, F.L. Goncales, Jr., . . . J. Yu, *Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection.* N Engl J Med, 2002. **347**(13): p. 975-982.
51. Jacobson, I.M., J.G. McHutchison, G. Dusheiko, A.M. Di Bisceglie, K.R. Reddy, N.H. Bzowej, . . . S. Zeuzem, *Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection.* N Engl J Med, 2011. **364**(25): p. 2405-2416.
52. Kwo, P.Y., E.J. Lawitz, J. McCone, E.R. Schiff, J.M. Vierling, D. Pound, . . . J.K. Albrecht, *Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naive patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial.* Lancet, 2010. **376**(9742): p. 705-716.
53. Meuleman, P., J. Bukh, L. Verhoye, A. Farhoudi, T. Vanwolleghem, R.Y. Wang, . . . G. Leroux-Roels, *In vivo evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus.* Hepatology, 2011. **53**(3): p. 755-762.

54. Helle, F., C. Wychowski, N. Vu-Dac, K.R. Gustafson, C. Voisset, and J. Dubuisson, *Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans*. J Biol Chem, 2006. **281**(35): p. 25177-25183.
55. Meuleman, P., J. Hesselgesser, M. Paulson, T. Vanwolleghem, I. Desombere, H. Reiser, and G. Leroux-Roels, *Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 1761-1768.
56. Fofana, I., S.E. Krieger, F. Grunert, S. Glauben, F. Xiao, S. Fafi-Kremer, . . . T.F. Baumert, *Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes*. Gastroenterology, 2010. **139**(3): p. 953-964, 964 e951-954.
57. Syder, A.J., H. Lee, M.B. Zeisel, J. Grove, E. Soulier, J. Macdonald, . . . F. Wong-Staal, *Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors*. J Hepatol, 2011. **54**(1): p. 48-55.
58. Lorenz, I.C., *The Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 2 (NS2): An Up-and-Coming Antiviral Drug Target*. Viruses, 2010. **2**(8): p. 1635-1646.
59. Frick, D.N., *HCV Helicase: Structure, Function, and Inhibition*. 2006.
60. Membreno, F.E. and E.J. Lawitz, *The HCV NS5B nucleoside and non-nucleoside inhibitors*. Clin Liver Dis, 2011. **15**(3): p. 611-626.
61. Pockros, P.J., D. Nelson, E. Godofsky, M. Rodriguez-Torres, G.T. Everson, M.W. Fried, . . . G. Hill, *R1626 plus peginterferon Alfa-2a provides potent suppression of hepatitis C virus RNA and significant antiviral synergy in combination with ribavirin*. Hepatology, 2008. **48**(2): p. 385-397.

62. Hebner, C.M., B. Han, K.M. Brendza, M. Nash, M. Sulfab, Y. Tian, . . . U. Schmitz, *The HCV non-nucleoside inhibitor Tegobuvir utilizes a novel mechanism of action to inhibit NS5B polymerase function*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39163.
63. Paul, D., I. Romero-Brey, J. Gouttenoire, S. Stoitsova, J. Krijnse-Locker, D. Moradpour, and R. Bartenschlager, *NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes*. J Virol, 2011. **85**(14): p. 6963-6976.
64. Einav, S., H.D. Sobol, E. Gehrig, and J.S. Glenn, *The hepatitis C virus (HCV) NS4B RNA binding inhibitor clemizole is highly synergistic with HCV protease inhibitors*. J Infect Dis, 2010. **202**(1): p. 65-74.
65. Tellinghuisen, T.L., K.L. Foss, and J. Treadaway, *Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein*. PLoS Pathog, 2008. **4**(3): p. e1000032.
66. Pol, S., R.H. Ghalib, V.K. Rustgi, C. Martorell, G.T. Everson, H.A. Tatum, . . . S. Schnittman, *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. **12**(9): p. 671-677.
67. Foster, T.L., P. Gallay, N.J. Stonehouse, and M. Harris, *Cyclophilin A interacts with domain II of hepatitis C virus NS5A and stimulates RNA binding in an isomerase-dependent manner*. J Virol, 2011. **85**(14): p. 7460-7464.
68. Coelmont, L., X. Hanouille, U. Chatterji, C. Berger, J. Snoeck, M. Bobardt, . . . J. Neyts, *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**(10): p. e13687.
69. Barba, G., F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, . . . C. Brechot, *Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(4): p. 1200-1205.
70. Kota, S., L. Scampavia, T. Spicer, A.B. Beeler, V. Takahashi, J.K. Snyder, . . . A.D. Strosberg, *A time-resolved fluorescence-resonance energy transfer assay for identifying inhibitors of hepatitis C virus core dimerization.* Assay Drug Dev Technol, 2010. **8**(1): p. 96-105.
71. Herker, E., C. Harris, C. Hernandez, A. Carpentier, K. Kaehlcke, A.R. Rosenberg, . . . M. Ott, *Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1.* Nat Med, 2010. **16**(11): p. 1295-1298.
72. Chevalier, C., A. Saulnier, Y. Benureau, D. Flechet, D. Delgrange, F. Colbere-Garapin, . . . A. Martin, *Inhibition of hepatitis C virus infection in cell culture by small interfering RNAs.* Mol Ther, 2007. **15**(8): p. 1452-1462.
73. McHutchison, J.G., K. Patel, P. Pockros, L. Nyberg, S. Pianko, R.Z. Yu, . . . T.J. Kwoh, *A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients.* J Hepatol, 2006. **44**(1): p. 88-96.
74. Konno, K., S. Fujita, M. Iizuka, S. Nishikawa, T. Hasegawa, and K. Fukuda, *Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the HCV minus-IRES domain I.* Nucleic Acids Symp Ser (Oxf), 2008(52): p. 493-494.

75. Trepanier, J.B., J.E. Tanner, and C. Alfieri, *Reduction in intracellular HCV RNA and virus protein expression in human hepatoma cells following treatment with 2'-O-methyl-modified anti-core deoxyribozyme*. *Virology*, 2008. **377**(2): p. 339-344.
76. Henke, J.I., D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C.G. Schuttler, C. Fehr, . . . M. Niepmann, *microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA*. *Embo J*, 2008. **27**(24): p. 3300-3310.
77. Jopling, C.L., M. Yi, A.M. Lancaster, S.M. Lemon, and P. Sarnow, *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA*. *Science*, 2005. **309**(5740): p. 1577-1581.
78. Hildebrandt-Eriksen, E.S., V. Aarup, R. Persson, H.F. Hansen, M.E. Munk, and H. Orum, *A locked nucleic acid oligonucleotide targeting microRNA 122 is well-tolerated in cynomolgus monkeys*. *Nucleic Acid Ther*, 2012. **22**(3): p. 152-161.
79. Ryoo, S.R., H. Jang, K.S. Kim, B. Lee, K.B. Kim, Y.K. Kim, . . . D.H. Min, *Functional delivery of DNzyme with iron oxide nanoparticles for hepatitis C virus gene knockdown*. *Biomaterials*, 2012. **33**(9): p. 2754-2761.
80. Chandra, P.K., A.K. Kundu, S. Hazari, S. Chandra, L. Bao, T. Ooms, . . . S. Dash, *Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Intracellular Delivery of Multiple siRNAs by Nanosomes*. *Mol Ther*, 2012. **20**(9): p. 1724-1736.
81. Pereira, A.A. and I.M. Jacobson, *New and experimental therapies for HCV*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009. **6**(7): p. 403-411.
82. Lee, J., C.C. Wu, K.J. Lee, T.H. Chuang, K. Katakura, Y.T. Liu, . . . D.A. Carson, *Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(6): p. 1828-1833.

83. Klade, C.S., E. Schuller, T. Boehm, A. von Gabain, and M.P. Manns, *Sustained viral load reduction in treatment-naive HCV genotype 1 infected patients after therapeutic peptide vaccination*. *Vaccine*, 2012. **30**(19): p. 2943-2950.
84. Farci, P., Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome [Science 1989;244:359-362]*. *J Hepatol*, 2002. **36**(5): p. 582-585.
85. Meyers, G. and H.J. Thiel, *Molecular characterization of pestiviruses*. *Adv Virus Res*, 1996. **47**: p. 53-118.
86. Kuno, G., G.J. Chang, K.R. Tsuchiya, N. Karabatsos, and C.B. Cropp, *Phylogeny of the genus Flavivirus*. *J Virol*, 1998. **72**(1): p. 73-83.
87. Howard, C.R., *Hepatitis C virus: clades and properties*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002. **17 Suppl**: p. S468-470.
88. Stapleton, J.T., S. Founq, A.S. Muerhoff, J. Bukh, and P. Simmonds, *The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae*. *J Gen Virol*, 2011. **92**(Pt 2): p. 233-246.
89. Fletcher, N.F., J.P. Yang, M.J. Farquhar, K. Hu, C. Davis, Q. He, . . . F. Wong-Staal, *Hepatitis C virus infection of neuroepithelioma cell lines*. *Gastroenterology*, 2010. **139**(4): p. 1365-1374.
90. Zignego, A.L., C. Giannini, M. Monti, and L. Gragnani, *Hepatitis C virus lymphotropism: lessons from a decade of studies*. *Dig Liver Dis*, 2007. **39 Suppl 1**: p. S38-45.

91. Marukian, S., C.T. Jones, L. Andrus, M.J. Evans, K.D. Ritola, E.D. Charles, . . . L.B. Dustin, *Cell culture-produced hepatitis C virus does not infect peripheral blood mononuclear cells*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 1843-1850.
92. Rocha-Perugini, V., C. Montpellier, D. Delgrange, C. Wychowski, F. Helle, A. Pillez, . . . L. Cocquerel, *The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1866.
93. Fukuhara, T. and Y. Matsuura, *Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection*. J Gastroenterol, 2013. **48**(2): p. 169-176.
94. Ogata, N., H.J. Alter, R.H. Miller, and R.H. Purcell, *Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3392-3396.
95. Zein, N.N., *Clinical significance of hepatitis C virus genotypes*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(2): p. 223-235.
96. Smith, D.B., S. Pathirana, F. Davidson, E. Lawlor, J. Power, P.L. Yap, and P. Simmonds, *The origin of hepatitis C virus genotypes*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 2): p. 321-328.
97. Simmonds, P., *The origin and evolution of hepatitis viruses in humans*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 4): p. 693-712.
98. Simmonds, P., *Reconstructing the origins of human hepatitis viruses*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001. **356**(1411): p. 1013-1026.
99. Simmonds, P., *Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 11): p. 3173-3188.

100. Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, . . . A. Widell, *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 962-973.
101. Troesch, M., I. Meunier, P. Lapierre, N. Lapointe, F. Alvarez, M. Boucher, and H. Soudeyns, *Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein*. Virology, 2006. **352**(2): p. 357-367.
102. Martell, M., J.I. Esteban, J. Quer, J. Genesca, A. Weiner, R. Esteban, . . . J. Gomez, *Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution*. J Virol, 1992. **66**(5): p. 3225-3229.
103. Kamal, S.M., *Genotypic variations around the world: Is hepatitis C virus evolving?* Current Hepatitis Reports, 2006. **Volume 5**(october): p. 142-149.
104. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, . . . T.J. Liang, *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 791-796.
105. Andre, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J.L. Berland, M. Sodoyer, . . . V. Lotteau, *Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles*. J Virol, 2002. **76**(14): p. 6919-6928.
106. Vieyres, G., X. Thomas, V. Descamps, G. Duverlie, A.H. Patel, and J. Dubuisson, *Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 10159-10168.

107. Ishida, S., M. Kaito, M. Kohara, K. Tsukiyama-Kohora, N. Fujita, J. Ikoma, . . . S. Watanabe, *Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique*. *Hepatol Res*, 2001. **20**(3): p. 335-347.
108. Andre, P., G. Perlemuter, A. Budkowska, C. Brechot, and V. Lotteau, *Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism*. *Semin Liver Dis*, 2005. **25**(1): p. 93-104.
109. Cheng, J.C., M.F. Chang, and S.C. Chang, *Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA*. *J Virol*, 1999. **73**(8): p. 7044-7049.
110. Wang, C., P. Sarnow, and A. Siddiqui, *Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism*. *J Virol*, 1993. **67**(6): p. 3338-3344.
111. Reynolds, J.E., A. Kaminski, A.R. Carroll, B.E. Clarke, D.J. Rowlands, and R.J. Jackson, *Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon*. *Rna*, 1996. **2**(9): p. 867-878.
112. Walewski, J.L., T.R. Keller, D.D. Stump, and A.D. Branch, *Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame*. *Rna*, 2001. **7**(5): p. 710-721.
113. Jopling, C.L., *Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122*. *Biochem Soc Trans*, 2008. **36**(Pt 6): p. 1220-1223.
114. Jopling, C., *Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function*. *RNA Biol*, 2012. **9**(2): p. 137-142.

115. Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, and T. Tuschl, *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. *Curr Biol*, 2002. **12**(9): p. 735-739.
116. Pang, P.S., E.A. Pham, M. Elazar, S.G. Patel, M.R. Eckart, and J.S. Glenn, *Structural map of a microRNA-122: hepatitis C virus complex*. *J Virol*, 2012. **86**(2): p. 1250-1254.
117. Roberts, A.P., A.P. Lewis, and C.L. Jopling, *miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(17): p. 7716-7729.
118. Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice, *Replication of hepatitis C virus*. *Nat Rev Microbiol*, 2007. **5**(6): p. 453-463.
119. Hussy, P., H. Langen, J. Mous, and H. Jacobsen, *Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase*. *Virology*, 1996. **224**(1): p. 93-104.
120. Lemberg, M.K. and B. Martoglio, *Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis*. *Mol Cell*, 2002. **10**(4): p. 735-744.
121. Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, J. Mous, and H. Jacobsen, *Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing*. *J Virol*, 1994. **68**(8): p. 5045-5055.
122. McLauchlan, J., M.K. Lemberg, G. Hope, and B. Martoglio, *Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets*. *Embo J*, 2002. **21**(15): p. 3980-3988.

123. Targett-Adams, P., G. Hope, S. Boulant, and J. McLauchlan, *Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production*. J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16850-16859.
124. Boulant, S., R. Montserret, R.G. Hope, M. Ratinier, P. Targett-Adams, J.P. Lavergne, . . . J. McLauchlan, *Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets*. J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 22236-22247.
125. Miyanari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, . . . K. Shimotohno, *The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(9): p. 1089-1097.
126. Branch, A.D., D.D. Stump, J.A. Gutierrez, F. Eng, and J.L. Walewski, *The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others*. Semin Liver Dis, 2005. **25**(1): p. 105-117.
127. Xu, Z., J. Choi, T.S. Yen, W. Lu, A. Strohecker, S. Govindarajan, . . . J. Ou, *Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift*. Embo J, 2001. **20**(14): p. 3840-3848.
128. Wolf, M., M. Dimitrova, T.F. Baumert, and C. Schuster, *The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(9): p. 3054-3064.
129. McMullan, L.K., A. Grakoui, M.J. Evans, K. Mihalik, M. Puig, A.D. Branch, . . . C.M. Rice, *Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(8): p. 2879-2884.

130. Dubuisson, J., F. Penin, and D. Moradpour, *Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(11): p. 517-523.
131. Op De Beeck, A., L. Cocquerel, and J. Dubuisson, *Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 11): p. 2589-2595.
132. Cocquerel, L., A. Op de Beeck, M. Lambot, J. Roussel, D. Delgrange, A. Pillez, . . . J. Dubuisson, *Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins*. Embo J, 2002. **21**(12): p. 2893-2902.
133. Lavillette, D., E.I. Pecheur, P. Donot, J. Fresquet, J. Molle, R. Corbau, . . . F.L. Cosset, *Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus*. J Virol, 2007. **81**(16): p. 8752-8765.
134. Carrere-Kremer, S., C. Montpellier-Pala, L. Cocquerel, C. Wychowski, F. Penin, and J. Dubuisson, *Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 3720-3730.
135. Sakai, A., M.S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S.U. Emerson, R.H. Purcell, and J. Bukh, *The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11646-11651.
136. Luik, P., C. Chew, J. Aittoniemi, J. Chang, P. Wentworth, Jr., R.A. Dwek, . . . N. Zitzmann, *The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 12712-12716.

137. Griffin, S.D., L.P. Beales, D.S. Clarke, O. Worsfold, S.D. Evans, J. Jaeger, . . . D.J. Rowlands, *The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine*. FEBS Lett, 2003. **535**(1-3): p. 34-38.
138. Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A.H. Patel, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann, *Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions*. PLoS Pathog, 2007. **3**(7): p. e103.
139. Jones, C.T., C.L. Murray, D.K. Eastman, J. Tassello, and C.M. Rice, *Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus*. J Virol, 2007. **81**(16): p. 8374-8383.
140. Kolykhalov, A.A., K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice, *Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo*. J Virol, 2000. **74**(4): p. 2046-2051.
141. Hijikata, M., H. Mizushima, T. Akagi, S. Mori, N. Kakiuchi, N. Kato, . . . K. Shimotohno, *Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4665-4675.
142. Lorenz, I.C., J. Marcotrigiano, T.G. Dentzer, and C.M. Rice, *Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease*. Nature, 2006. **442**(7104): p. 831-835.
143. Yao, N., P. Reichert, S.S. Taremi, W.W. Prosser, and P.C. Weber, *Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase*. Structure, 1999. **7**(11): p. 1353-1363.
144. Wolk, B., D. Sansonno, H.G. Krausslich, F. Dammacco, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour, *Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the*

- hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines.* J Virol, 2000. **74**(5): p. 2293-2304.
145. Lamarre, D., P.C. Anderson, M. Bailey, P. Beaulieu, G. Bolger, P. Bonneau, . . . M. Llinas-Brunet, *An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus.* Nature, 2003. **426**(6963): p. 186-189.
146. Serebrov, V. and A.M. Pyle, *Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase.* Nature, 2004. **430**(6998): p. 476-480.
147. Ma, Y., J. Yates, Y. Liang, S.M. Lemon, and M. Yi, *NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly.* J Virol, 2008. **82**(15): p. 7624-7639.
148. Yu, G.Y., K.J. Lee, L. Gao, and M.M. Lai, *Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein.* J Virol, 2006. **80**(12): p. 6013-6023.
149. Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H.E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz, *Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex.* J Virol, 2002. **76**(12): p. 5974-5984.
150. Gouttenoire, J., P. Roingard, F. Penin, and D. Moradpour, *Amphipathic alpha-helix AH2 is a major determinant for the oligomerization of hepatitis C virus nonstructural protein 4B.* J Virol, 2010. **84**(24): p. 12529-12537.
151. Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, . . . D. Moradpour, *Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A.* J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40835-40843.

152. Appel, N., T. Pietschmann, and R. Bartenschlager, *Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 3187-3194.
153. Foster, T.L., T. Belyaeva, N.J. Stonehouse, A.R. Pearson, and M. Harris, *All three domains of the hepatitis C virus nonstructural NS5A protein contribute to RNA binding*. J Virol, 2010. **84**(18): p. 9267-9277.
154. Appel, N., M. Zayas, S. Miller, J. Krijnse-Locker, T. Schaller, P. Friebe, . . . R. Bartenschlager, *Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly*. PLoS Pathog, 2008. **4**(3): p. e1000035.
155. Butcher, S.J., J.M. Grimes, E.V. Makeyev, D.H. Bamford, and D.I. Stuart, *A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization*. Nature, 2001. **410**(6825): p. 235-240.
156. Bressanelli, S., L. Tomei, F.A. Rey, and R. De Francesco, *Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides*. J Virol, 2002. **76**(7): p. 3482-3492.
157. Moradpour, D., V. Brass, E. Bieck, P. Friebe, R. Gosert, H.E. Blum, . . . V. Lohmann, *Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication*. J Virol, 2004. **78**(23): p. 13278-13284.
158. Bartenschlager, R., M. Frese, and T. Pietschmann, *Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence*. Adv Virus Res, 2004. **63**: p. 71-180.
159. Lindenbach, B.D. and C.M. Rice, *Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 933-938.

160. Zeisel, M.B., I. Fofana, S. Fafi-Kremer, and T.F. Baumert, *Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies*. J Hepatol, 2011. **54**(3): p. 566-576.
161. Molina, S., V. Castet, C. Fournier-Wirth, L. Pichard-Garcia, R. Avner, D. Harats, . . . P. Maurel, *The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus*. J Hepatol, 2007. **46**(3): p. 411-419.
162. Albecka, A., S. Belouzard, A. Op de Beeck, V. Descamps, L. Goueslain, J. Bertrand-Michel, . . . J. Dubuisson, *Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle*. Hepatology, 2012. **55**(4): p. 998-1007.
163. Catanese, M.T., H. Ansuini, R. Graziani, T. Huby, M. Moreau, J.K. Ball, . . . A. Nicosia, *Role of scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus entry: kinetics and molecular determinants*. J Virol, 2010. **84**(1): p. 34-43.
164. Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R.M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, . . . A. Vitelli, *The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus*. Embo J, 2002. **21**(19): p. 5017-5025.
165. Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, . . . S. Abrignani, *Binding of hepatitis C virus to CD81*. Science, 1998. **282**(5390): p. 938-941.
166. Brazzoli, M., A. Bianchi, S. Filippini, A. Weiner, Q. Zhu, M. Pizza, and S. Crotta, *CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8316-8329.
167. Harris, H.J., C. Davis, J.G. Mullins, K. Hu, M. Goodall, M.J. Farquhar, . . . J.A. McKeating, *Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry*. J Biol Chem, 2010. **285**(27): p. 21092-21102.

168. Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski, and Y. Rouille, *Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis*. J Virol, 2006. **80**(14): p. 6964-6972.
169. Tscherne, D.M., C.T. Jones, M.J. Evans, B.D. Lindenbach, J.A. McKeating, and C.M. Rice, *Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry*. J Virol, 2006. **80**(4): p. 1734-1741.
170. Coller, K.E., K.L. Berger, N.S. Heaton, J.D. Cooper, R. Yoon, and G. Randall, *RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis*. PLoS Pathog, 2009. **5**(12): p. e1000702.
171. Timpe, J.M., Z. Stamataki, A. Jennings, K. Hu, M.J. Farquhar, H.J. Harris, . . . J.A. McKeating, *Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies*. Hepatology, 2008. **47**(1): p. 17-24.
172. Ploss, A. and J. Dubuisson, *New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets*. Gut, 2012. **61 Suppl 1**: p. i25-35.
173. Quinkert, D., R. Bartenschlager, and V. Lohmann, *Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex*. J Virol, 2005. **79**(21): p. 13594-13605.
174. Kozak, M., *Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes*. Cell, 1986. **44**(2): p. 283-292.
175. Komar, A.A. and M. Hatzoglou, *Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 23425-23428.

176. Hoffman, B. and Q. Liu, *Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals*. Liver Int, 2011. **31**(10): p. 1449-1467.
177. Pudi, R., S. Abhiman, N. Srinivasan, and S. Das, *Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12231-12240.
178. Mondal, T., U. Ray, A.K. Manna, R. Gupta, S. Roy, and S. Das, *Structural determinant of human La protein critical for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA*. J Virol, 2008. **82**(23): p. 11927-11938.
179. Paek, K.Y., C.S. Kim, S.M. Park, J.H. Kim, and S.K. Jang, *RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA*. J Virol, 2008. **82**(24): p. 12082-12093.
180. Niepmann, M., *Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1789**(9-10): p. 529-541.
181. Brocard, M., S. Paulous, A.V. Komarova, V. Deveaux, and K.M. Kean, *Evidence that PTB does not stimulate HCV IRES-driven translation*. Virus Genes, 2006.
182. Goergen, D. and M. Niepmann, *Stimulation of Hepatitis C Virus RNA translation by microRNA-122 occurs under different conditions in vivo and in vitro*. Virus Res, 2012. **167**(2): p. 343-352.
183. Shimakami, T., D. Yamane, R.K. Jangra, B.J. Kempf, C. Spaniel, D.J. Barton, and S.M. Lemon, *Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(3): p. 941-946.

184. Murakami, Y., H.H. Aly, A. Tajima, I. Inoue, and K. Shimotohno, *Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a*. J Hepatol, 2009. **50**(3): p. 453-460.
185. Hou, W., Q. Tian, J. Zheng, and H.L. Bonkovsky, *MicroRNA-196 represses Bach1 protein and hepatitis C virus gene expression in human hepatoma cells expressing hepatitis C viral proteins*. Hepatology, 2010. **51**(5): p. 1494-1504.
186. Lourenco, S., F. Costa, B. Debarges, T. Andrieu, and A. Cahour, *Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by cis-acting RNA elements and trans-acting viral factors*. Febs J, 2008. **275**(16): p. 4179-4197.
187. Gosert, R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H.E. Blum, K. Bienz, and D. Moradpour, *Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons*. J Virol, 2003. **77**(9): p. 5487-5492.
188. Bartenschlager, R., F.L. Cosset, and V. Lohmann, *Hepatitis C virus replication cycle*. J Hepatol, 2010. **53**(3): p. 583-585.
189. Miyanari, Y., M. Hijikata, M. Yamaji, M. Hosaka, H. Takahashi, and K. Shimotohno, *Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50301-50308.
190. Tang, H. and H. Grise, *Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis*. Clin Sci (Lond), 2009. **117**(2): p. 49-65.
191. Schuster, C., C. Isel, I. Imbert, C. Ehresmann, R. Marquet, and M.P. Kieny, *Secondary structure of the 3' terminus of hepatitis C virus minus-strand RNA*. J Virol, 2002. **76**(16): p. 8058-8068.

192. Suzuki, T., K. Ishii, H. Aizaki, and T. Wakita, *Hepatitis C viral life cycle*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(12): p. 1200-1212.
193. Randall, G., M. Panis, J.D. Cooper, T.L. Tellinghuisen, K.E. Sukhodolets, S. Pfeffer, . . . C.M. Rice, *Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(31): p. 12884-12889.
194. Lupberger, J., L. Brino, and T.F. Baumert, *RNAi: a powerful tool to unravel hepatitis C virus-host interactions within the infectious life cycle*. J Hepatol, 2008. **48**(3): p. 523-525.
195. Berger, K.L., J.D. Cooper, N.S. Heaton, R. Yoon, T.E. Oakland, T.X. Jordan, . . . G. Randall, *Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(18): p. 7577-7582.
196. Reiss, S., I. Rebhan, P. Backes, I. Romero-Brey, H. Erfle, P. Matula, . . . R. Bartenschlager, *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**(1): p. 32-45.
197. Moriishi, K. and Y. Matsuura, *Host factors involved in the replication of hepatitis C virus*. Rev Med Virol, 2007. **17**(5): p. 343-354.
198. Gao, L., H. Aizaki, J.W. He, and M.M. Lai, *Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft*. J Virol, 2004. **78**(7): p. 3480-3488.
199. Hamamoto, I., Y. Nishimura, T. Okamoto, H. Aizaki, M. Liu, Y. Mori, . . . Y. Matsuura, *Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B*. J Virol, 2005. **79**(21): p. 13473-13482.

200. Kaul, A., S. Stauffer, C. Berger, T. Pertel, J. Schmitt, S. Kallis, . . . R. Bartenschlager, *Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics*. PLoS Pathog, 2009. **5**(8): p. e1000546.
201. Aizaki, H., K.S. Choi, M. Liu, Y.J. Li, and M.M. Lai, *Polypyrimidine-tract-binding protein is a component of the HCV RNA replication complex and necessary for RNA synthesis*. J Biomed Sci, 2006. **13**(4): p. 469-480.
202. Dreux, M., P. Gastaminza, S.F. Wieland, and F.V. Chisari, *The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 14046-14051.
203. Guevin, C., D. Manna, C. Belanger, K.V. Konan, P. Mak, and P. Labonte, *Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection*. Virology, 2010. **405**(1): p. 1-7.
204. Dreux, M. and F.V. Chisari, *Impact of the autophagy machinery on hepatitis C virus infection*. Viruses, 2011. **3**(8): p. 1342-1357.
205. Tanida, I., M. Fukasawa, T. Ueno, E. Kominami, T. Wakita, and K. Hanada, *Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles*. Autophagy, 2009. **5**(7): p. 937-945.
206. Targett-Adams, P., S. Boulant, M.W. Douglas, and J. McLauchlan, *Lipid metabolism and HCV infection*. Viruses, 2010. **2**(5): p. 1195-1217.
207. McLauchlan, J., *Lipid droplets and hepatitis C virus infection*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 552-559.

208. Popescu, C.I., Y. Rouille, and J. Dubuisson, *Hepatitis C virus assembly imaging*. *Viruses*, 2011. **3**(11): p. 2238-2254.
209. Boulant, S., M.W. Douglas, L. Moody, A. Budkowska, P. Targett-Adams, and J. McLauchlan, *Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner*. *Traffic*, 2008. **9**(8): p. 1268-1282.
210. Rouille, Y., F. Helle, D. Delgrange, P. Roingeard, C. Voisset, E. Blanchard, . . . J. Dubuisson, *Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus*. *J Virol*, 2006. **80**(6): p. 2832-2841.
211. Evans, M.J., C.M. Rice, and S.P. Goff, *Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(35): p. 13038-13043.
212. Gastaminza, P., G. Cheng, S. Wieland, J. Zhong, W. Liao, and F.V. Chisari, *Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion*. *J Virol*, 2008. **82**(5): p. 2120-2129.
213. Chang, K.S., J. Jiang, Z. Cai, and G. Luo, *Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture*. *J Virol*, 2007. **81**(24): p. 13783-13793.
214. Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager, *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line*. *Science*, 1999. **285**(5424): p. 110-113.
215. Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset, *Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes*. *J Exp Med*, 2003. **197**(5): p. 633-642.

216. Baumert, T.F., J. Vergalla, J. Satoi, M. Thomson, M. Lechmann, D. Herion, . . . T.J. Liang, *Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate*. Gastroenterology, 1999. **117**(6): p. 1397-1407.
217. Wellnitz, S., B. Klumpp, H. Barth, S. Ito, E. Depla, J. Dubuisson, . . . T.F. Baumert, *Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines*. J Virol, 2002. **76**(3): p. 1181-1193.
218. Steinmann, D., H. Barth, B. Gissler, P. Schurmann, M.I. Adah, J.T. Gerlach, . . . T.F. Baumert, *Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C*. J Virol, 2004. **78**(17): p. 9030-9040.
219. Lohmann, V., F. Korner, A. Dobierzewska, and R. Bartenschlager, *Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation*. J Virol, 2001. **75**(3): p. 1437-1449.
220. Bukh, J., T. Pietschmann, V. Lohmann, N. Krieger, K. Faulk, R.E. Engle, . . . R. Bartenschlager, *Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14416-14421.
221. Pietschmann, T., M. Zayas, P. Meuleman, G. Long, N. Appel, G. Koutsoudakis, . . . R. Bartenschlager, *Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations*. PLoS Pathog, 2009. **5**(6): p. e1000475.
222. Kato, T., T. Date, M. Miyamoto, A. Furusaka, K. Tokushige, M. Mizokami, and T. Wakita, *Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon*. Gastroenterology, 2003. **125**(6): p. 1808-1817.

223. Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D.R. Burton, . . . F.V. Chisari, *Robust hepatitis C virus infection in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(26): p. 9294-9299.
224. Lindenbach, B.D., M.J. Evans, A.J. Syder, B. Wolk, T.L. Tellinghuisen, C.C. Liu, . . . C.M. Rice, *Complete replication of hepatitis C virus in cell culture*. Science, 2005. **309**(5734): p. 623-626.
225. Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, . . . R. Bartenschlager, *Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(19): p. 7408-7413.
226. Tariq, H., S. Manzoor, F. Parvaiz, F. Javed, K. Fatima, and I. Qadri, *An overview: in vitro models of HCV replication in different cell cultures*. Infect Genet Evol, 2012. **12**(1): p. 13-20.
227. Koutsoudakis, G., S. Perez-del-Pulgar, M. Coto-Llerena, P. Gonzalez, J. Dragan, L. Mensa, . . . X. Forns, *Cell culture replication of a genotype 1b hepatitis C virus isolate cloned from a patient who underwent liver transplantation*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23587.
228. Date, T., K. Morikawa, Y. Tanaka, K. Tanaka-Kaneko, T. Sata, M. Mizokami, and T. Wakita, *Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone*. Microbiol Immunol, 2012. **56**(5): p. 308-317.
229. Bradley, D.W., *Studies of non-A, non-B hepatitis and characterization of the hepatitis C virus in chimpanzees*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. **242**: p. 1-23.

230. Feinstone, S.M., H.J. Alter, H.P. Dienes, Y. Shimizu, H. Popper, D. Blackmore, . . . R.H. Purcell, *Non-A, non-B hepatitis in chimpanzees and marmosets*. J Infect Dis, 1981. **144**(6): p. 588-598.
231. Karayiannis, P., P.J. Scheuer, M. Bamber, D. Cohn, B.A. Hurn, and H.C. Thomas, *Experimental infection of Tamarins with human non-A, non-B hepatitis virus*. J Med Virol, 1983. **11**(3): p. 251-256.
232. Xie, Z.C., J.I. Riezu-Boj, J.J. Lasarte, J. Guillen, J.H. Su, M.P. Civeira, and J. Prieto, *Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews*. Virology, 1998. **244**(2): p. 513-520.
233. Mercer, D.F., D.E. Schiller, J.F. Elliott, D.N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, . . . N.M. Kneteman, *Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 927-933.
234. Guevin, C., A. Lamarre, and P. Labonte, *Novel HCV replication mouse model using human hepatocellular carcinoma xenografts*. Antiviral Res, 2009. **84**(1): p. 14-22.
235. Bukh, J., *Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease*. Gastroenterology, 2012. **142**(6): p. 1279-1287 e1273.
236. Doudna, J.A., *Structural genomics of RNA*. Nat Struct Biol, 2000. **7 Suppl**: p. 954-956.
237. Novina, C.D. and P.A. Sharp, *The RNAi revolution*. Nature, 2004. **430**(6996): p. 161-164.
238. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-297.

239. Winkler, W.C. and R.R. Breaker, *Regulation of bacterial gene expression by riboswitches*. *Annu Rev Microbiol*, 2005. **59**: p. 487-517.
240. Wachter, A., *Riboswitch-mediated control of gene expression in eukaryotes*. *RNA Biol*, 2010. **7**(1): p. 67-76.
241. Kruger, K., P.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sands, D.E. Gottschling, and T.R. Cech, *Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena*. *Cell*, 1982. **31**(1): p. 147-157.
242. Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello, *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 806-811.
243. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-854.
244. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. *Nature*, 2004. **431**(7006): p. 350-355.
245. Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, and S. Altman, *The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme*. *Cell*, 1983. **35**(3 Pt 2): p. 849-857.
246. Saldanha, R., G. Mohr, M. Belfort, and A.M. Lambowitz, *Group I and group II introns*. *Faseb J*, 1993. **7**(1): p. 15-24.
247. Lai, L.B., A. Vioque, L.A. Kirsebom, and V. Gopalan, *Unexpected diversity of RNase P, an ancient tRNA processing enzyme: challenges and prospects*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(2): p. 287-296.

248. Symons, R.H., *Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(14): p. 2683-2689.
249. Lai, M.M., *The molecular biology of hepatitis delta virus*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 259-286.
250. Flores, R., S. Ruiz-Ruiz, and P. Serra, *Viroids and hepatitis delta virus*. Semin Liver Dis, 2012. **32**(3): p. 201-210.
251. Sudarsan, N., J.E. Barrick, and R.R. Breaker, *Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes*. Rna, 2003. **9**(6): p. 644-647.
252. Liu, Y., E. Wimmer, and A.V. Paul, *Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1789**(9-10): p. 495-517.
253. Pelletier, J. and N. Sonenberg, *Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA*. Nature, 1988. **334**(6180): p. 320-325.
254. Johnson, S.F. and A. Telesnitsky, *Retroviral RNA dimerization and packaging: the what, how, when, where, and why*. PLoS Pathog, 2010. **6**(10): p. e1001007.
255. Fernandez-Miragall, O., S. Lopez de Quinto, and E. Martinez-Salas, *Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements*. Virus Res, 2009. **139**(2): p. 172-182.
256. Martinez-Salas, E., S. Lopez de Quinto, R. Ramos, and O. Fernandez-Miragall, *IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity*. Biochimie, 2002. **84**(8): p. 755-763.

257. Belsham, G.J. and N. Sonenberg, *RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation*. Microbiol Rev, 1996. **60**(3): p. 499-511.
258. Jang, S.K., H.G. Krausslich, M.J. Nicklin, G.M. Duke, A.C. Palmenberg, and E. Wimmer, *A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation*. J Virol, 1988. **62**(8): p. 2636-2643.
259. Lopez-Lastra, M., A. Rivas, and M.I. Barria, *Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation*. Biol Res, 2005. **38**(2-3): p. 121-146.
260. Jang, S.K., *Internal initiation: IRES elements of picornaviruses and hepatitis c virus*. Virus Res, 2006. **119**(1): p. 2-15.
261. Sarnow, P., *Translation of glucose-regulated protein 78/immunoglobulin heavy-chain binding protein mRNA is increased in poliovirus-infected cells at a time when cap-dependent translation of cellular mRNAs is inhibited*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5795-5799.
262. Baird, S.D., M. Turcotte, R.G. Korneluk, and M. Holcik, *Searching for IRES*. Rna, 2006. **12**(10): p. 1755-1785.
263. Kieft, J.S., *Viral IRES RNA structures and ribosome interactions*. Trends Biochem Sci, 2008. **33**(6): p. 274-283.
264. Wilson, J.E., M.J. Powell, S.E. Hoover, and P. Sarnow, *Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(14): p. 4990-4999.

265. Hatakeyama, Y., N. Shibuya, T. Nishiyama, and N. Nakashima, *Structural variant of the intergenic internal ribosome entry site elements in dicistroviruses and computational search for their counterparts*. Rna, 2004. **10**(5): p. 779-786.
266. Martinez-Salas, E., R. Ramos, E. Lafuente, and S. Lopez de Quinto, *Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 5): p. 973-984.
267. Goodfellow, I., Y. Chaudhry, A. Richardson, J. Meredith, J.W. Almond, W. Barclay, and D.J. Evans, *Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region*. J Virol, 2000. **74**(10): p. 4590-4600.
268. Mason, P.W., S.V. Bezborodova, and T.M. Henry, *Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus*. J Virol, 2002. **76**(19): p. 9686-9694.
269. Agol, V.I., A.V. Paul, and E. Wimmer, *Paradoxes of the replication of picornaviral genomes*. Virus Res, 1999. **62**(2): p. 129-147.
270. Yu, H., C.W. Grassmann, and S.E. Behrens, *Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhea virus genomic RNA: functional role during RNA replication*. J Virol, 1999. **73**(5): p. 3638-3648.
271. Yi, M. and S.M. Lemon, *Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication*. Rna, 2003. **9**(3): p. 331-345.
272. Zeng, L., B. Falgout, and L. Markoff, *Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3'-SL in the dengue type 2 virus genome required for replication*. J Virol, 1998. **72**(9): p. 7510-7522.

273. Zoll, J., H.A. Heus, F.J. van Kuppeveld, and W.J. Melchers, *The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR*. *Virus Res*, 2009. **139**(2): p. 209-216.
274. McKnight, K.L. and S.M. Lemon, *The rhinovirus type 14 genome contains an internally located RNA structure that is required for viral replication*. *Rna*, 1998. **4**(12): p. 1569-1584.
275. Brian, D.A. and R.S. Baric, *Coronavirus genome structure and replication*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005. **287**: p. 1-30.
276. An, M., H.O. Iwakawa, A. Mine, M. Kaido, K. Mise, and T. Okuno, *A Y-shaped RNA structure in the 3' untranslated region together with the trans-activator and core promoter of Red clover necrotic mosaic virus RNA2 is required for its negative-strand RNA synthesis*. *Virology*, 2010. **405**(1): p. 100-109.
277. Karn, J., *Tackling Tat*. *J Mol Biol*, 1999. **293**(2): p. 235-254.
278. Isel, C. and J. Karn, *Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation*. *J Mol Biol*, 1999. **290**(5): p. 929-941.
279. Upert, G., A. Di Giorgio, A. Upadhyay, D. Manvar, N. Pandey, V.N. Pandey, and N. Patino, *Inhibition of HIV Replication by Cyclic and Hairpin PNAs Targeting the HIV-1 TAR RNA Loop*. *J Nucleic Acids*, 2012. **2012**: p. 591025.
280. Huthoff, H. and B. Berkhout, *Multiple secondary structure rearrangements during HIV-1 RNA dimerization*. *Biochemistry*, 2002. **41**(33): p. 10439-10445.
281. D'Souza, V. and M.F. Summers, *How retroviruses select their genomes*. *Nat Rev Microbiol*, 2005. **3**(8): p. 643-655.

282. Fischer, U., S. Meyer, M. Teufel, C. Heckel, R. Luhrmann, and G. Rautmann, *Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA*. *Embo J*, 1994. **13**(17): p. 4105-4112.
283. Olsen, H.S., P. Nelbock, A.W. Cochrane, and C.A. Rosen, *Secondary structure is the major determinant for interaction of HIV rev protein with RNA*. *Science*, 1990. **247**(4944): p. 845-848.
284. Hoffmann, D., D. Schwarck, C. Banning, M. Brenner, L. Mariyanna, M. Krepstakies, . . . J. Hauber, *Formation of trans-activation competent HIV-1 Rev:RRE complexes requires the recruitment of multiple protein activation domains*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38305.
285. Walpita, P. and C.J. Peters, *Cis-acting elements in the antigenomic promoter of Nipah virus*. *J Gen Virol*, 2007. **88**(Pt 9): p. 2542-2551.
286. Cowton, V.M., D.R. McGivern, and R. Fearn, *Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis*. *J Gen Virol*, 2006. **87**(Pt 7): p. 1805-1821.
287. Weik, M., S. Enterlein, K. Schlenz, and E. Muhlberger, *The Ebola virus genomic replication promoter is bipartite and follows the rule of six*. *J Virol*, 2005. **79**(16): p. 10660-10671.
288. Liang, Y., T. Huang, H. Ly, T.G. Parslow, and Y. Liang, *Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments*. *J Virol*, 2008. **82**(1): p. 229-236.
289. Li, W., E. Manktelow, J.C. von Kirchbach, J.R. Gog, U. Desselberger, and A.M. Lever, *Genomic analysis of codon, sequence and structural conservation with selective biochemical-structure mapping reveals highly conserved and dynamic structures in*

- rotavirus RNAs with potential cis-acting functions*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(21): p. 7718-7735.
290. Qi, Z.T., G. Kalkeri, J. Hanible, R. Prabhu, F. Bastian, R.F. Garry, and S. Dash, *Stem-loop structures II-IV of the 5' untranslated sequences are required for the expression of the full-length hepatitis C virus genome*. Arch Virol, 2003. **148**(3): p. 449-467.
291. Honda, M., M.R. Beard, L.H. Ping, and S.M. Lemon, *A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1165-1174.
292. Lyons, A.J., J.R. Lytle, J. Gomez, and H.D. Robertson, *Hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA contains a tertiary structural element in a functional domain of stem-loop II*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(12): p. 2535-2541.
293. Collier, A.J., J. Gallego, R. Klinck, P.T. Cole, S.J. Harris, G.P. Harrison, . . . S. Walker, *A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(5): p. 375-380.
294. Jubin, R., N.E. Vantuno, J.S. Kieft, M.G. Murray, J.A. Doudna, J.Y. Lau, and B.M. Baroudy, *Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIIId contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding*. J Virol, 2000. **74**(22): p. 10430-10437.
295. Lukavsky, P.J., G.A. Otto, A.M. Lancaster, P. Sarnow, and J.D. Puglisi, *Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(12): p. 1105-1110.

296. Wang, C., P. Sarnow, and A. Siddiqui, *A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 7301-7307.
297. Brown, E.A., H. Zhang, L.H. Ping, and S.M. Lemon, *Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(19): p. 5041-5045.
298. Lukavsky, P.J., *Structure and function of HCV IRES domains*. Virus Res, 2009. **139**(2): p. 166-171.
299. Kieft, J.S., K. Zhou, R. Jubin, M.G. Murray, J.Y. Lau, and J.A. Doudna, *The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold*. J Mol Biol, 1999. **292**(3): p. 513-529.
300. Pestova, T.V., I.N. Shatsky, S.P. Fletcher, R.J. Jackson, and C.U. Hellen, *A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs*. Genes Dev, 1998. **12**(1): p. 67-83.
301. Lyons, A.J. and H.D. Robertson, *Detection of tRNA-like structure through RNase P cleavage of viral internal ribosome entry site RNAs near the AUG start triplet*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26844-26850.
302. Wang, C., S.Y. Le, N. Ali, and A. Siddiqui, *An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region*. Rna, 1995. **1**(5): p. 526-537.

303. Boehringer, D., R. Thermann, A. Ostareck-Lederer, J.D. Lewis, and H. Stark, *Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES*. Structure, 2005. **13**(11): p. 1695-1706.
304. Kieft, J.S., K. Zhou, A. Grech, R. Jubin, and J.A. Doudna, *Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(5): p. 370-374.
305. Rodriguez-Casado, A., J. Bartolome, V. Carreno, M. Molina, and P. Carmona, *Structural characterization of the 5' untranslated RNA of hepatitis C virus by vibrational spectroscopy*. Biophys Chem, 2006. **124**(1): p. 73-79.
306. Lukavsky, P.J., I. Kim, G.A. Otto, and J.D. Puglisi, *Structure of HCV IRES domain II determined by NMR*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(12): p. 1033-1038.
307. Honda, M., E.A. Brown, and S.M. Lemon, *Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA*. Rna, 1996. **2**(10): p. 955-968.
308. Rijnbrand, R.C., T.E. Abbink, P.C. Haasnoot, W.J. Spaan, and P.J. Bredenbeek, *The influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5' nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window*. Virology, 1996. **226**(1): p. 47-56.
309. Easton, L.E., N. Locker, and P.J. Lukavsky, *Conserved functional domains and a novel tertiary interaction near the pseudoknot drive translational activity of hepatitis C virus and hepatitis C virus-like internal ribosome entry sites*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(16): p. 5537-5549.
310. Fraser, C.S. and J.A. Doudna, *Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(1): p. 29-38.

311. Otto, G.A. and J.D. Puglisi, *The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation*. Cell, 2004. **119**(3): p. 369-380.
312. Hellen, C.U., *IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1789**(9-10): p. 558-570.
313. Buratti, E., S. Tisminetzky, M. Zotti, and F.E. Baralle, *Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(13): p. 3179-3187.
314. Yen, J.H., S.C. Chang, C.R. Hu, S.C. Chu, S.S. Lin, Y.S. Hsieh, and M.F. Chang, *Cellular proteins specifically bind to the 5'-noncoding region of hepatitis C virus RNA*. Virology, 1995. **208**(2): p. 723-732.
315. Berry, K.E., S. Waghray, and J.A. Doudna, *The HCV IRES pseudoknot positions the initiation codon on the 40S ribosomal subunit*. Rna, 2010. **16**(8): p. 1559-1569.
316. Locker, N., L.E. Easton, and P.J. Lukavsky, *HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly*. Embo J, 2007. **26**(3): p. 795-805.
317. Honda, M., R. Rijnbrand, G. Abell, D. Kim, and S.M. Lemon, *Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal entry site*. J Virol, 1999. **73**(6): p. 4941-4951.
318. Robert, F., L.D. Kapp, S.N. Khan, M.G. Acker, S. Kolitz, S. Kazemi, . . . J. Pelletier, *Initiation of protein synthesis by hepatitis C virus is refractory to reduced eIF2.GTP.Met-tRNAiMet ternary complex availability*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(11): p. 4632-4644.

319. Terenin, I.M., S.E. Dmitriev, D.E. Andreev, and I.N. Shatsky, *Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2*. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. **15**(8): p. 836-841.
320. Blight, K.J. and C.M. Rice, *Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA*. *J Virol*, 1997. **71**(10): p. 7345-7352.
321. Ito, T. and M.M. Lai, *Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome*. *J Virol*, 1997. **71**(11): p. 8698-8706.
322. Tanaka, T., N. Kato, M.J. Cho, K. Sugiyama, and K. Shimotohno, *Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome*. *J Virol*, 1996. **70**(5): p. 3307-3312.
323. Kolykhalov, A.A., S.M. Feinstone, and C.M. Rice, *Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA*. *J Virol*, 1996. **70**(6): p. 3363-3371.
324. Yamada, N., K. Tanihara, A. Takada, T. Yorihuri, M. Tsutsumi, H. Shimomura, . . . T. Date, *Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome*. *Virology*, 1996. **223**(1): p. 255-261.
325. Han, J.H. and M. Houghton, *Group specific sequences and conserved secondary structures at the 3' end of HCV genome and its implication for viral replication*. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(13): p. 3520.
326. Dutkiewicz, M. and J. Ciesiolka, *Structural characterization of the highly conserved 98-base sequence at the 3' end of HCV RNA genome and the complementary sequence*

- located at the 5' end of the replicative viral strand.* Nucleic Acids Res, 2005. **33**(2): p. 693-703.
327. Smith, R.M., C.M. Walton, C.H. Wu, and G.Y. Wu, *Secondary structure and hybridization accessibility of hepatitis C virus 3'-terminal sequences.* J Virol, 2002. **76**(19): p. 9563-9574.
328. Dutkiewicz, M., A. Swiatkowska, M. Figlerowicz, and J. Ciesiolka, *Structural domains of the 3'-terminal sequence of the hepatitis C virus replicative strand.* Biochemistry, 2008. **47**(46): p. 12197-12207.
329. Mahias, K., N. Ahmed-El-Sayed, C. Masante, J. Bitard, C. Staedel, F. Darfeuille, . . . T. Astier-Gin, *Identification of a structural element of the hepatitis C virus minus strand RNA involved in the initiation of RNA synthesis.* Nucleic Acids Res, 2010. **38**(12): p. 4079-4091.
330. Ishido, S., T. Fujita, and H. Hotta, *Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **244**(1): p. 35-40.
331. Banerjee, R. and A. Dasgupta, *Specific interaction of hepatitis C virus protease/helicase NS3 with the 3'-terminal sequences of viral positive- and negative-strand RNA.* J Virol, 2001. **75**(4): p. 1708-1721.
332. Binder, M., D. Quinkert, O. Bochkarova, R. Klein, N. Kezmic, R. Bartenschlager, and V. Lohmann, *Identification of determinants involved in initiation of hepatitis C virus RNA synthesis by using intergenotypic replicase chimeras.* J Virol, 2007. **81**(10): p. 5270-5283.

333. Murayama, A., L. Weng, T. Date, D. Akazawa, X. Tian, T. Suzuki, . . . T. Toyoda, *RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000885.
334. Murayama, A., T. Date, K. Morikawa, D. Akazawa, M. Miyamoto, M. Kaga, . . . T. Wakita, *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**(15): p. 8030-8040.
335. Chinnaswamy, S., I. Yarbrough, S. Palaninathan, C.T. Kumar, V. Vijayaraghavan, B. Demeler, . . . C.C. Kao, *A locking mechanism regulates RNA synthesis and host protein interaction by the hepatitis C virus polymerase*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 20535-20546.
336. Cramer, J., J. Jaeger, and T. Restle, *Biochemical and pre-steady-state kinetic characterization of the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B Δ 21, HC-J4)*. Biochemistry, 2006. **45**(11): p. 3610-3619.
337. Qin, W., H. Luo, T. Nomura, N. Hayashi, T. Yamashita, and S. Murakami, *Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase*. J Biol Chem, 2002. **277**(3): p. 2132-2137.
338. Wang, Q.M., M.A. Hockman, K. Staschke, R.B. Johnson, K.A. Case, J. Lu, . . . J.M. Colacino, *Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 3865-3872.
339. Chinnaswamy, S., A. Murali, P. Li, K. Fujisaki, and C.C. Kao, *Regulation of de novo-initiated RNA synthesis in hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase by intermolecular interactions*. J Virol, 2010. **84**(12): p. 5923-5935.

340. Oh, J.W., G.T. Sheu, and M.M. Lai, *Template requirement and initiation site selection by hepatitis C virus polymerase on a minimal viral RNA template*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17710-17717.
341. Oh, J.W., T. Ito, and M.M. Lai, *A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7694-7702.
342. Kim, M., H. Kim, S.P. Cho, and M.K. Min, *Template requirements for de novo RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase on the viral X RNA*. J Virol, 2002. **76**(14): p. 6944-6956.
343. Hong, Z., C.E. Cameron, M.P. Walker, C. Castro, N. Yao, J.Y. Lau, and W. Zhong, *A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase*. Virology, 2001. **285**(1): p. 6-11.
344. Ferrari, E., J. Wright-Minogue, J.W. Fang, B.M. Baroudy, J.Y. Lau, and Z. Hong, *Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1649-1654.
345. Zhong, W., E. Ferrari, C.A. Lesburg, D. Maag, S.K. Ghosh, C.E. Cameron, . . . Z. Hong, *Template/primer requirements and single nucleotide incorporation by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase*. J Virol, 2000. **74**(19): p. 9134-9143.
346. Reigadas, S., M. Ventura, L. Sarih-Cottin, M. Castroviejo, S. Litvak, and T. Astier-Gin, *HCV RNA-dependent RNA polymerase replicates in vitro the 3' terminal region of the minus-strand viral RNA more efficiently than the 3' terminal region of the plus RNA*. Eur J Biochem, 2001. **268**(22): p. 5857-5867.

347. Ye, L., K.A. Timani, L. Ye, L. Kong, X. Yang, Q. Liao, and J. Wu, *Two cis-acting elements in negative RNA strand of Hepatitis C virus involved in synthesis of positive RNA strand in vitro*. *Acta Virol*, 2005. **49**(2): p. 83-90.
348. Friebe, P. and R. Bartenschlager, *Role of RNA structures in genome terminal sequences of the hepatitis C virus for replication and assembly*. *J Virol*, 2009. **83**(22): p. 11989-11995.
349. Astier-Gin, T., P. Bellecave, S. Litvak, and M. Ventura, *Template requirements and binding of hepatitis C virus NS5B polymerase during in vitro RNA synthesis from the 3'-end of virus minus-strand RNA*. *Febs J*, 2005. **272**(15): p. 3872-3886.
350. Reigadas, S., M. Ventura, M.L. Andreola, J. Michel, S. Gryaznov, L. Tarrago-Litvak, . . . T. Astier-Gin, *An oligonucleotide complementary to the SL-B1 domain in the 3'-end of the minus-strand RNA of the hepatitis C virus inhibits in vitro initiation of RNA synthesis by the viral polymerase*. *Virology*, 2003. **314**(1): p. 206-220.
351. Friebe, P., V. Lohmann, N. Krieger, and R. Bartenschlager, *Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication*. *J Virol*, 2001. **75**(24): p. 12047-12057.
352. Yanagi, M., M. St Claire, S.U. Emerson, R.H. Purcell, and J. Bukh, *In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 2291-2295.
353. Yi, M. and S.M. Lemon, *3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA*. *J Virol*, 2003. **77**(6): p. 3557-3568.

354. Kolykhalov, A.A., E.V. Agapov, K.J. Blight, K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice, *Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA*. Science, 1997. **277**(5325): p. 570-574.
355. Friebe, P. and R. Bartenschlager, *Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication*. J Virol, 2002. **76**(11): p. 5326-5338.
356. You, S. and C.M. Rice, *3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U)*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 184-195.
357. Shetty, S., S. Kim, T. Shimakami, S.M. Lemon, and M.R. Mihailescu, *Hepatitis C virus genomic RNA dimerization is mediated via a kissing complex intermediate*. Rna, 2010. **16**(5): p. 913-925.
358. Ivanyi-Nagy, R., I. Kanevsky, C. Gabus, J.P. Lavergne, D. Ficheux, F. Penin, . . . J.L. Darlix, *Analysis of hepatitis C virus RNA dimerization and core-RNA interactions*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(9): p. 2618-2633.
359. Cristofari, G., R. Ivanyi-Nagy, C. Gabus, S. Boulant, J.P. Lavergne, F. Penin, and J.L. Darlix, *The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(8): p. 2623-2631.
360. Sharma, K.K., H. de Rocquigny, J.L. Darlix, J.P. Lavergne, F. Penin, J.M. Lessinger, and Y. Mely, *Analysis of the RNA chaperoning activity of the hepatitis C virus core protein on the conserved 3'X region of the viral genome*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(6): p. 2540-2553.

361. Gontarek, R.R., L.L. Gutshall, K.M. Herold, J. Tsai, G.M. Sathe, J. Mao, . . . A.M. Del Vecchio, *hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3'NTR of the HCV RNA genome*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(6): p. 1457-1463.
362. Spangberg, K., L. Wiklund, and S. Schwartz, *HuR, a protein implicated in oncogene and growth factor mRNA decay, binds to the 3' ends of hepatitis C virus RNA of both polarities*. Virology, 2000. **274**(2): p. 378-390.
363. Chang, K.S. and G. Luo, *The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is required for efficient replication of hepatitis C virus (HCV) RNA*. Virus Res, 2006. **115**(1): p. 1-8.
364. Tingting, P., F. Caiyun, Y. Zhigang, Y. Pengyuan, and Y. Zhenghong, *Subproteomic analysis of the cellular proteins associated with the 3' untranslated region of the hepatitis C virus genome in human liver cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(3): p. 683-691.
365. Tsuchihara, K., T. Tanaka, M. Hijikata, S. Kuge, H. Toyoda, A. Nomoto, . . . K. Shimotohno, *Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X*. J Virol, 1997. **71**(9): p. 6720-6726.
366. Spangberg, K., L. Goobar-Larsson, M. Wahren-Herlenius, and S. Schwartz, *The La protein from human liver cells interacts specifically with the U-rich region in the hepatitis C virus 3' untranslated region*. J Hum Virol, 1999. **2**(5): p. 296-307.

367. Domitrovich, A.M., K.W. Diebel, N. Ali, S. Sarker, and A. Siddiqui, *Role of La autoantigen and polypyrimidine tract-binding protein in HCV replication*. *Virology*, 2005. **335**(1): p. 72-86.
368. Hofacker, I.L., M. Fekete, C. Flamm, M.A. Huynen, S. Rauscher, P.E. Stolorz, and P.F. Stadler, *Automatic detection of conserved RNA structure elements in complete RNA virus genomes*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(16): p. 3825-3836.
369. Vassilaki, N., P. Friebe, P. Meuleman, S. Kallis, A. Kaul, G. Paranhos-Baccala, . . . R. Bartenschlager, *Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication*. *J Virol*, 2008. **82**(23): p. 11503-11515.
370. Tuplin, A., J. Wood, D.J. Evans, A.H. Patel, and P. Simmonds, *Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus*. *Rna*, 2002. **8**(6): p. 824-841.
371. Tuplin, A., D.J. Evans, and P. Simmonds, *Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods*. *J Gen Virol*, 2004. **85**(Pt 10): p. 3037-3047.
372. Thurner, C., C. Witwer, I.L. Hofacker, and P.F. Stadler, *Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes*. *J Gen Virol*, 2004. **85**(Pt 5): p. 1113-1124.
373. Kim, Y.K., S.H. Lee, C.S. Kim, S.K. Seol, and S.K. Jang, *Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation*. *Rna*, 2003. **9**(5): p. 599-606.

374. Lee, H., H. Shin, E. Wimmer, and A.V. Paul, *cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10865-10877.
375. You, S., D.D. Stump, A.D. Branch, and C.M. Rice, *A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication*. J Virol, 2004. **78**(3): p. 1352-1366.
376. Yamashita, T., S. Kaneko, Y. Shirota, W. Qin, T. Nomura, K. Kobayashi, and S. Murakami, *RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15479-15486.
377. Friebe, P., J. Boudet, J.P. Simorre, and R. Bartenschlager, *Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication*. J Virol, 2005. **79**(1): p. 380-392.
378. Shetty, S., S. Stefanovic, and M.R. Mihailescu, *Hepatitis C virus RNA: molecular switches mediated by long-range RNA-RNA interactions?* Nucleic Acids Res, 2013. **41**(4): p. 2526-2540.
379. Diviney, S., A. Tuplin, M. Struthers, V. Armstrong, R.M. Elliott, P. Simmonds, and D.J. Evans, *A hepatitis C virus cis-acting replication element forms a long-range RNA-RNA interaction with upstream RNA sequences in NS5B*. J Virol, 2008. **82**(18): p. 9008-9022.
380. Tuplin, A., M. Struthers, P. Simmonds, and D.J. Evans, *A twist in the tail: SHAPE mapping of long-range interactions and structural rearrangements of RNA elements involved in HCV replication*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(14): p. 6908-6921.

381. Romero-Lopez, C. and A. Berzal-Herranz, *The functional RNA domain 5BSL3.2 within the NS5B coding sequence influences hepatitis C virus IRES-mediated translation*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(1): p. 103-113.
382. Romero-Lopez, C. and A. Berzal-Herranz, *A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome*. Rna, 2009. **15**(9): p. 1740-1752.
383. Song, Y., P. Friebe, E. Tzima, C. Junemann, R. Bartenschlager, and M. Niepmann, *The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site*. J Virol, 2006. **80**(23): p. 11579-11588.
384. Bradrick, S.S., R.W. Walters, and M. Gromeier, *The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(4): p. 1293-1303.
385. Bung, C., Z. Bochkaeva, I. Terenin, R. Zinovkin, I.N. Shatsky, and M. Niepmann, *Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation*. FEBS Lett, 2010. **584**(4): p. 837-842.
386. Romero-Lopez, C., B. Berzal-Herranz, J. Gomez, and A. Berzal-Herranz, *An engineered inhibitor RNA that efficiently interferes with hepatitis C virus translation and replication*. Antiviral Res, 2012. **94**(2): p. 131-138.
387. Romero-Lopez, C., A. Barroso-Deljesus, A. Garcia-Sacristan, C. Briones, and A. Berzal-Herranz, *The folding of the hepatitis C virus internal ribosome entry site depends on the 3'-end of the viral genome*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(22): p. 11697-11713.

388. Kim, Y.K., C.S. Kim, S.H. Lee, and S.K. Jang, *Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **290**(1): p. 105-112.
389. Luo, G., S. Xin, and Z. Cai, *Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA*. *J Virol*, 2003. **77**(5): p. 3312-3318.
390. Gamarnik, A.V. and R. Andino, *Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus*. *Genes Dev*, 1998. **12**(15): p. 2293-2304.
391. Davis, M., S.M. Sagan, J.P. Pezacki, D.J. Evans, and P. Simmonds, *Bioinformatic and physical characterizations of genome-scale ordered RNA structure in mammalian RNA viruses*. *J Virol*, 2008. **82**(23): p. 11824-11836.
392. Simmonds, P., A. Tuplin, and D.J. Evans, *Detection of genome-scale ordered RNA structure (GORS) in genomes of positive-stranded RNA viruses: Implications for virus evolution and host persistence*. *Rna*, 2004. **10**(9): p. 1337-1351.
393. Simmonds, P., I. Karakasiliotis, D. Bailey, Y. Chaudhry, D.J. Evans, and I.G. Goodfellow, *Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(8): p. 2530-2546.
394. Gallie, D.R., *The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency*. *Genes Dev*, 1991. **5**(11): p. 2108-2116.
395. Tarun, S.Z., Jr. and A.B. Sachs, *A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast*. *Genes Dev*, 1995. **9**(23): p. 2997-3007.

396. Kahvejian, A., Y.V. Svitkin, R. Sukarieh, M.N. M'Boutchou, and N. Sonenberg, *Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms*. Genes Dev, 2005. **19**(1): p. 104-113.
397. Isken, O., C.W. Grassmann, R.T. Sarisky, M. Kann, S. Zhang, F. Grosse, . . . S.E. Behrens, *Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus*. Embo J, 2003. **22**(21): p. 5655-5665.
398. Hahn, C.S., Y.S. Hahn, C.M. Rice, E. Lee, L. Dalgarno, E.G. Strauss, and J.H. Strauss, *Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences*. J Mol Biol, 1987. **198**(1): p. 33-41.
399. Herold, J. and R. Andino, *Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 581-591.
400. Miller, W.A. and K.A. White, *Long-distance RNA-RNA interactions in plant virus gene expression and replication*. Annu Rev Phytopathol, 2006. **44**: p. 447-467.
401. Khromykh, A.A., H. Meka, K.J. Guyatt, and E.G. Westaway, *Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication*. J Virol, 2001. **75**(14): p. 6719-6728.
402. Alvarez, D.E., M.F. Lodeiro, S.J. Luduena, L.I. Pietrasanta, and A.V. Gamarnik, *Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 6631-6643.
403. Filomatori, C.V., M.F. Lodeiro, D.E. Alvarez, M.M. Samsa, L. Pietrasanta, and A.V. Gamarnik, *A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome*. Genes Dev, 2006. **20**(16): p. 2238-2249.

404. Alvarez, D.E., C.V. Filomatori, and A.V. Gamarnik, *Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs*. *Virology*, 2008. **375**(1): p. 223-235.
405. Villordo, S.M. and A.V. Gamarnik, *Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication*. *Virus Res*, 2009. **139**(2): p. 230-239.
406. Gebhard, L.G., C.V. Filomatori, and A.V. Gamarnik, *Functional RNA elements in the dengue virus genome*. *Viruses*, 2011. **3**(9): p. 1739-1756.
407. Friebe, P. and E. Harris, *Interplay of RNA elements in the dengue virus 5' and 3' ends required for viral RNA replication*. *J Virol*, 2010. **84**(12): p. 6103-6118.
408. Ooms, M., T.E. Abbink, C. Pham, and B. Berkhout, *Circularization of the HIV-1 RNA genome*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(15): p. 5253-5261.
409. Beerens, N. and J. Kijms, *Circularization of the HIV-1 genome facilitates strand transfer during reverse transcription*. *Rna*, 2010. **16**(6): p. 1226-1235.
410. Ito, T., S.M. Tahara, and M.M. Lai, *The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site*. *J Virol*, 1998. **72**(11): p. 8789-8796.
411. Weinlich, S., S. Huttelmaier, A. Schierhorn, S.E. Behrens, A. Ostareck-Lederer, and D.H. Ostareck, *IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR*. *Rna*, 2009. **15**(8): p. 1528-1542.
412. Ali, N. and A. Siddiqui, *Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation*. *J Virol*, 1995. **69**(10): p. 6367-6375.

413. Luo, G., *Cellular proteins bind to the poly(U) tract of the 3' untranslated region of hepatitis C virus RNA genome*. *Virology*, 1999. **256**(1): p. 105-118.
414. Ito, T. and M.M. Lai, *An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence*. *Virology*, 1999. **254**(2): p. 288-296.
415. McCaffrey, A.P., K. Ohashi, L. Meuse, S. Shen, A.M. Lancaster, P.J. Lukavsky, . . . M.A. Kay, *Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice*. *Mol Ther*, 2002. **5**(6): p. 676-684.
416. Wang, L., K.S. Jeng, and M.M. Lai, *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**(16): p. 7954-7964.
417. Chong, L.W., Y.C. Hsu, Y.T. Chiu, K.C. Yang, and Y.T. Huang, *Anti-fibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats*. *J Biomed Sci*, 2006. **13**(3): p. 403-418.
418. Keifer, J.A., D.C. Guttridge, B.P. Ashburner, and A.S. Baldwin, Jr., *Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(25): p. 22382-22387.
419. Buck, M., *Direct infection and replication of naturally occurring hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3 and 4 in normal human hepatocyte cultures*. *PLoS One*, 2008. **3**(7): p. e2660.

420. Takamizawa, A., C. Mori, I. Fuke, S. Manabe, S. Murakami, J. Fujita, . . . H. Okayama, *Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1105-1113.
421. Evans, M.J., T. von Hahn, D.M. Tscherne, A.J. Syder, M. Panis, B. Wolk, . . . C.M. Rice, *Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry*. Nature, 2007. **446**(7137): p. 801-805.
422. Kato, T., T. Date, A. Murayama, K. Morikawa, D. Akazawa, and T. Wakita, *Cell culture and infection system for hepatitis C virus*. Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2334-2339.
423. Rance, E., J.E. Tanner, and C. Alfieri, *Inhibition of IkappaB kinase by thalidomide increases hepatitis C virus RNA replication*. J Viral Hepat, 2012. **19**(2): p. e73-80.
424. Liu, S., L. Xiao, C. Nelson, and C. Hagedorn, *A Cell Culture Adapted HCV JFH1 Variant That Increases Viral Titers and Permits the Production of High Titer Infectious Chimeric Reporter Viruses*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44965.
425. Krieger, N., V. Lohmann, and R. Bartenschlager, *Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations*. J Virol, 2001. **75**(10): p. 4614-4624.
426. Lohmann, V., S. Hoffmann, U. Herian, F. Penin, and R. Bartenschlager, *Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 3007-3019.
427. Wellinger, R.E., R. Lucchini, R. Dammann, and J.M. Sogo, *In vivo mapping of nucleosomes using psoralen-DNA crosslinking and primer extension*. Methods Mol Biol, 1999. **119**: p. 161-173.

428. Harris, D., Z. Zhang, B. Chaubey, and V.N. Pandey, *Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome*. *Mol Cell Proteomics*, 2006. **5**(6): p. 1006-1018.
429. Cordero, P., W. Kladwang, C.C. VanLang, and R. Das, *Quantitative dimethyl sulfate mapping for automated RNA secondary structure inference*. *Biochemistry*, 2012. **51**(36): p. 7037-7039.
430. Varani, G. and W.H. McClain, *The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems*. *EMBO Rep*, 2000. **1**(1): p. 18-23.
431. Villordo, S.M., D.E. Alvarez, and A.V. Gamarnik, *A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication*. *Rna*, 2010. **16**(12): p. 2325-2335.
432. Das, A.T., M.M. Vrolijk, A. Harwig, and B. Berkhout, *Opening of the TAR hairpin in the HIV-1 genome causes aberrant RNA dimerization and packaging*. *Retrovirology*, 2012. **9**(1): p. 59.
433. Ali, N., G.J. Pruijn, D.J. Kenan, J.D. Keene, and A. Siddiqui, *Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(36): p. 27531-27540.
434. Perera, R., S. Daijogo, B.L. Walter, J.H. Nguyen, and B.L. Semler, *Cellular protein modification by poliovirus: the two faces of poly(rC)-binding protein*. *J Virol*, 2007. **81**(17): p. 8919-8932.
435. Preiss, T. and W.H. M, *Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation*. *Bioessays*, 2003. **25**(12): p. 1201-1211.

436. Martell, M., C. Briones, A. de Vicente, M. Piron, J.I. Esteban, R. Esteban, . . . J. Gomez, *Structural analysis of hepatitis C RNA genome using DNA microarrays*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(11): p. e90.
437. Calvet, J.P. and T. Pederson, *Photochemical cross-linking of secondary structure in HeLa cell heterogeneous nuclear RNA in situ I*. *Nucleic Acids Res*, 1979. **6**(5): p. 1993-2001.
438. Calvet, J.P. and T. Pederson, *Heterogeneous nuclear RNA double-stranded regions probed in living HeLa cells by crosslinking with the psoralen derivative aminomethyltrioxsalen*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(2): p. 755-759.
439. Tijerina, P., S. Mohr, and R. Russell, *DMS footprinting of structured RNAs and RNA-protein complexes*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(10): p. 2608-2623.
440. Wells, S.E., J.M. Hughes, A.H. Igel, and M. Ares, Jr., *Use of dimethyl sulfate to probe RNA structure in vivo*. *Methods Enzymol*, 2000. **318**: p. 479-493.
441. Forstemann, K. and J. Lingner, *Telomerase limits the extent of base pairing between template RNA and telomeric DNA*. *EMBO Rep*, 2005. **6**(4): p. 361-366.
442. Merino, E.J., K.A. Wilkinson, J.L. Coughlan, and K.M. Weeks, *RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE)*. *J Am Chem Soc*, 2005. **127**(12): p. 4223-4231.
443. Wilkinson, K.A., S.M. Vasa, K.E. Deigan, S.A. Mortimer, M.C. Giddings, and K.M. Weeks, *Influence of nucleotide identity on ribose 2'-hydroxyl reactivity in RNA*. *Rna*, 2009. **15**(7): p. 1314-1321.

444. Lucks, J.B., S.A. Mortimer, C. Trapnell, S. Luo, S. Aviran, G.P. Schroth, . . . A.P. Arkin, *Multiplexed RNA structure characterization with selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension sequencing (SHAPE-Seq)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(27): p. 11063-11068.
445. Semrad, K., *Proteins with RNA chaperone activity: a world of diverse proteins with a common task-impediment of RNA misfolding*. Biochem Res Int, 2011. **2011**: p. 532908.
446. Sharma, S., C. Maris, F.H. Allain, and D.L. Black, *U1 snRNA directly interacts with polypyrimidine tract-binding protein during splicing repression*. Mol Cell, 2011. **41**(5): p. 579-588.
447. Liu, Z.R., B. Sargueil, and C.W. Smith, *Methylene blue-mediated cross-linking of proteins to double-stranded RNA*. Methods Enzymol, 2000. **318**: p. 22-33.
448. Schroeder, S.J., *Advances in RNA structure prediction from sequence: new tools for generating hypotheses about viral RNA structure-function relationships*. J Virol, 2009. **83**(13): p. 6326-6334.
449. Saunders, L.R. and G.N. Barber, *The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions*. Faseb J, 2003. **17**(9): p. 961-983.
450. Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, . . . T. Fujita, *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-737.
451. Goodbourn, S., L. Didcock, and R.E. Randall, *Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 10): p. 2341-2364.

452. Sharp, T.V., M. Schwemmler, I. Jeffrey, K. Laing, H. Mellor, C.G. Proud, . . . M.J. Clemens, *Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA*. *Nucleic Acids Res*, 1993. **21**(19): p. 4483-4490.
453. Gunnery, S., A.P. Rice, H.D. Robertson, and M.B. Mathews, *Tat-responsive region RNA of human immunodeficiency virus 1 can prevent activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(22): p. 8687-8691.
454. Lim, Y.S. and W.R. Kim, *The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease*. *Clin Liver Dis*, 2008. **12**(4): p. 733-746, vii.
455. Muriel, P., *NF-kappaB in liver diseases: a target for drug therapy*. *J Appl Toxicol*, 2009. **29**(2): p. 91-100.
456. Raufman, J.P. and L.W. Lamps, *Thalidomide-induced normalization of serum ALT levels in a patient with hepatitis C*. *Am J Gastroenterol*, 2001. **96**(11): p. 3209-3211.
457. Schijman, A., R. Colina, S. Mukomolov, O. Kalinina, L. Garcia, S. Broor, . . . J. Cristina, *Comparison of hepatitis C viral loads in patients with or without coinfection with different genotypes*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004. **11**(2): p. 433-435.
458. Moynagh, P.N., *TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(9): p. 469-476.
459. Hiscott, J., T.L. Nguyen, M. Arguello, P. Nakhaei, and S. Paz, *Manipulation of the nuclear factor-kappaB pathway and the innate immune response by viruses*. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6844-6867.

460. Vallabhapurapu, S. and M. Karin, *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 693-733.
461. Choi, S.H., K.J. Park, B.Y. Ahn, G. Jung, M.M. Lai, and S.B. Hwang, *Hepatitis C virus nonstructural 5B protein regulates tumor necrosis factor alpha signaling through effects on cellular IkappaB kinase*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(8): p. 3048-3059.
462. Wang, R.P., M. Zhang, Y. Li, F.C. Diao, D. Chen, Z. Zhai, and H.B. Shu, *Differential regulation of IKK alpha-mediated activation of IRF3/7 by NIK*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(7): p. 1926-1934.
463. Trepanier, J.B., J.E. Tanner, and C. Alfieri, *Oligonucleotide-based therapeutic options against hepatitis C virus infection*. *Antivir Ther*, 2006. **11**(3): p. 273-287.
464. Tallet-Lopez, B., L. Aldaz-Carroll, S. Chabas, E. Dausse, C. Staedel, and J.J. Toulme, *Antisense oligonucleotides targeted to the domain III_d of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent in vitro translation*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(2): p. 734-742.
465. Aldaz-Carroll, L., B. Tallet, E. Dausse, L. Yurchenko, and J.J. Toulme, *Apical loop-internal loop interactions: a new RNA-RNA recognition motif identified through in vitro selection against RNA hairpins of the hepatitis C virus mRNA*. *Biochemistry*, 2002. **41**(18): p. 5883-5893.
466. Trepanier, J., J.E. Tanner, R.L. Momparler, O.N. Le, F. Alvarez, and C. Alfieri, *Cleavage of intracellular hepatitis C RNA in the virus core protein coding region by deoxyribozymes*. *J Viral Hepat*, 2006. **13**(2): p. 131-138.
467. Kanda, T., R. Steele, R. Ray, and R.B. Ray, *Small Interfering Rna Targeted To Hepatitis C Virus 5'nontranslated Region Exerts Potent Antiviral Effect*. *J Virol*, 2006.

468. Prabhu, R., R.F. Garry, and S. Dash, *Small interfering RNA targeted to stem-loop II of the 5' untranslated region effectively inhibits expression of six HCV genotypes*. *Virology*, 2006. **3**: p. 100.
469. Chevalier, C., A. Saulnier, Y. Benureau, D. Flechet, D. Delgrange, F. Colbere-Garapin, . . . A. Martin, *Inhibition of Hepatitis C Virus Infection in Cell Culture by Small Interfering RNAs*. *Mol Ther*, 2007.
470. Ahn, D.G., S.B. Shim, J.E. Moon, J.H. Kim, S.J. Kim, and J.W. Oh, *Interference of hepatitis C virus replication in cell culture by antisense peptide nucleic acids targeting the X-RNA*. *J Viral Hepat*, 2011. **18**(7): p. e298-306.
471. Soler, M., J.G. McHutchison, T.J. Kwok, F.A. Dorr, and J.M. Pawlotsky, *Virological effects of ISIS 14803, an antisense oligonucleotide inhibitor of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES), on HCV IRES in chronic hepatitis C patients and examination of the potential role of primary and secondary HCV resistance in the outcome of treatment*. *Antivir Ther*, 2004. **9**(6): p. 953-968.
472. Marton, S., C. Romero-Lopez, and A. Berzal-Herranz, *RNA aptamer-mediated interference of HCV replication by targeting the CRE-5BSL3.2 domain*. *J Viral Hepat*, 2013. **20**(2): p. 103-112.
473. Boya, P., E. Larrea, I. Sola, P.L. Majano, C. Jimenez, M.P. Civeira, and J. Prieto, *Nuclear factor-kappa B in the liver of patients with chronic hepatitis C: decreased RelA expression is associated with enhanced fibrosis progression*. *Hepatology*, 2001. **34**(5): p. 1041-1048.

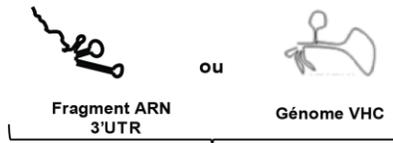
474. Wang, J., S.H. Basagoudanavar, X. Wang, E. Hopewell, R. Albrecht, A. Garcia-Sastre, . . . A.A. Beg, *NF-kappa B RelA subunit is crucial for early IFN-beta expression and resistance to RNA virus replication*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1720-1729.
475. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 141-179.
476. Brennan, F.M., R.N. Maini, and M. Feldmann, *Cytokine expression in chronic inflammatory disease*. Br Med Bull, 1995. **51**(2): p. 368-384.
477. Schwartz, M.D., E.E. Moore, F.A. Moore, R. Shenkar, P. Moine, J.B. Haenel, and E. Abraham, *Nuclear factor-kappa B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome*. Crit Care Med, 1996. **24**(8): p. 1285-1292.

Annexes

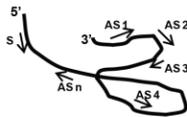
Annexe I : Détection des éléments ARN simple brin et double

brin

Génération des sondes radiomarquées



ARN traité :
exposé soit au **Psoralen+UV** soit au **DMS**



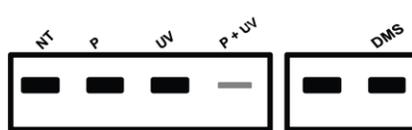
Les modifications dans l'ARN induites par psoralen +UV (ARNdb) ou par DMS (ARNsb) produit des ADNc abortifs et la perte des sondes radiomarquées

RT-PCR
nucléotide P³²

sonde marquée au P³²

Hybridation sur membranes
contenant la région ADN du 3'UTR

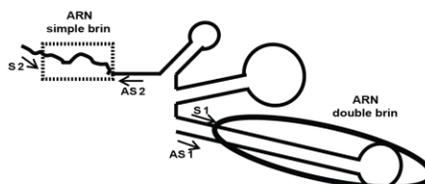
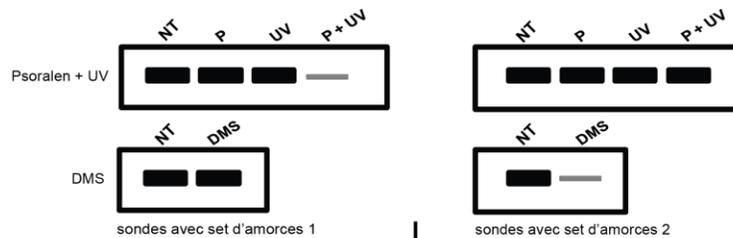
Southern - blot



Pour chaque set d'amorces, des sondes individuelles sont générées pour :

- _ ARN Non Traité (NT)
- _ ARN exposé au psoralen (P)
- _ ARN exposé aux UV (UV)
- _ ARN exposé au psoralen et UV (P+UV)
- OU
- _ ARN Non Traité (NT)
- _ ARN exposé au DMS (DMS)

Exemple de résultats



Psoralen + UV

Une diminution d'intensité de bande signifie un «crosslinking» (une région ARNdb)

DMS

Une diminution d'intensité de bande signifie une modification par le DMS (une région ARNsb)

Annexe II : Modèle dynamique de changement de conformations du génome du VHC lors de son cycle de réplication viral.

