

Université de Montréal

**Le rôle de la région variable du 3' UTR dans la réplication  
du virus de l'hépatite C**

par  
Sally Jaatoul

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en microbiologie et immunologie

Avril, 2017

© Sally Jaatoul, 2017

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette mémoire intitulée :

**Le rôle de la région variable du 3' UTR dans la réplication  
du virus de l'hépatite C**

Présenté par :  
Sally Jaatoul

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Guy Lemay, président-rapporteur  
Dre. Carolina Alfieri, directrice de recherche  
Dr. Marc Drolet, membre du jury

## Résumé

Le génome du virus de l'hépatite C (VHC), membre des Flaviviridae, est constitué d'un ARN monocaténaire linéaire de polarité positive, et contient un seul cadre de lecture ouvert flanqué par deux régions non traduites désignées 5'UTR et 3'UTR. Ces régions contiennent des éléments structurés qui sont importants pour la régulation des processus de traduction et de réplication virale. Mon projet de recherche vise le 3'UTR. Celui-ci a une structure tripartite composée d'une région variable (VR), une région poly (U/UC) et une région X. Notre laboratoire a identifié une séquence VR qui forme une structure duplexe avec une séquence distale située dans le NS5B. Considérant que le gène NS5B code pour la polymérase virale, et que la 3'UTR est impliquée dans la réplication virale, nous postulons que ce duplex pourrait contrôler le niveau de synthèse de l'ARN du VHC. Afin de tester cette hypothèse, nous avons construit des mutants individuels des séquences VR et NS5B du VHC 1b afin d'empêcher la formation du duplex, ainsi qu'un mutant complémentaire aux deux sites permettant la reconstitution du duplex. L'ARN provenant de ces constructions a été synthétisé *in vitro* et transfecté dans les cellules Huh7.5. Au 9<sup>e</sup> jour de culture, l'ARN a été extrait des cultures, et la technique RT-qPCR a été ensuite utilisée afin de quantifier et comparer les niveaux d'ARN viral provenant des cultures transfectées avec les mutants versus celles transfectées avec le virus parental. Les résultats obtenus montrent une augmentation de 5.3X et 3.4X, respectivement, entre les niveaux d'ARN viral produits de cultures transfectées avec le virus muté dans les régions 3'UTR-VR et NS5B, comparé au virus parental. Cependant, l'ARN viral obtenu suite à la reconstitution des deux sites complémentaires montre une augmentation de 2.6X. Malgré que la différence entre les niveaux d'ARN des virus mutants ne soit pas statistiquement significative lorsqu'on les compare avec le niveau d'ARN généré par le virus parental, la tendance suggère

que la fonction des séquences appariées serait de moduler à la baisse la synthèse de l'ARN viral. Il sera nécessaire de poursuivre davantage ce travail afin de mieux comprendre le rôle de la structure duplexe VR-NS5B sur la réplication du VHC.

**Mots-clés :** VHC, Flaviviridae, 3'UTR, VR, NS5B, réplication, interactions distales.

## **Abstract**

The hepatitis C virus (HCV), a member of the Flaviviridae, contains a single (+) strand linear RNA genome which incorporates one long open reading frame flanked by two untranslated regions known as the 5'UTR and 3'UTR. These regions contain structures known to function in the regulation of HCV translation and replication. The 3'UTR is the focus of this research project. Its tripartite structure consists of a variable region (VR), a poly (U/UC) region and the X-tail. Our laboratory recently identified a VR sequence forming a duplex structure with a distal sequence located in the NS5B gene. Because NS5B encodes the viral polymerase, and seeing that the 3'UTR is involved in viral replication, we postulated that this duplex may function in controlling the level of HCV RNA replication. To test this hypothesis, we constructed HCV 1b mutants in the respective VR and NS5B annealing sequences to disrupt complementarity and prevent duplex formation. We also created a mutant with complementary mutations at both sites to reconstitute the duplex. RNA from these constructs was synthesized *in vitro* and transfected into Huh7.5 cells. Following a 9-day incubation period, RNA from all transfected cultures was harvested and HCV RNA was quantified by RT-qPCR. The data indicate an increase of 5.3X and 3.4X for HCV viral RNA harvested from cultures with disrupted 3'UTR-VR and NS5B, respectively, relative to wild-type HCV 1b, whereas the reconstituted HCV construct yielded a 2.6X increase in viral RNA. While these figures do not reach statistical significance, they suggest that the duplex structure modulates HCV replication downward. Further pursuit of this work is necessary to better elucidate the role of the VR-NS5B duplex structure on HCV replication.

**Key words** : HCV, Flaviviridae, 3'UTR, VR, NS5B, replication, distal interactions, RNA structures.

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>x</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 L'hépatite C.....	1
1.1.1 Historique de l'hépatite C .....	1
1.1.2 L'épidémiologie et la prévalence.....	2
1.1.3 Les modes de transmission .....	3
1.1.4 Les maladies associées.....	4
1.2 Le virus de l'hépatite C .....	4
1.2.1 Classification du virus de l'hépatite C .....	4
1.2.2 Génotypes et sous-types.....	4
1.3 Caractéristiques générales du VHC.....	7
1.3.1 La structure .....	7
1.3.2 Organisation du génome .....	9

1.3.3	Protéines virales .....	10
1.4	Le cycle viral du VHC.....	20
1.4.1	L'attachement et l'entrée du virus .....	21
1.4.2	La traduction .....	24
1.4.3	La réplication .....	25
1.4.4	L'assemblage et la relâche des virions .....	27
1.5	Le génome du virus de l'hépatite C.....	28
1.5.1	Structure-fonction de la 5'UTR du VHC.....	30
1.5.2	Structure-fonction de la 3'UTR(+) du VHC.....	31
1.5.3	La région codante de NS5B .....	33
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATION, HYPOTHÈSE ET BUT DU PROJET DE RECHERCHE..</b>	<b>35</b>
<b>3.</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>37</b>
3.1	Culture cellulaire .....	37
3.2	Construction des mutants du VHC.....	37
3.3	Transformation et préparation d'ADN plasmidique .....	42
3.4	Expression des ARN génomiques du VHC.....	42
3.5	Transfection par électroporation .....	44
3.6	Viabilité cellulaire et efficacité de la transfection.....	44
3.7	Cinétique de production du VHC.....	45
3.8	Extraction de l'ARN du surnageant .....	46



3.9	Extraction de l'ARN des cellules transfectées .....	47
3.10	Quantification de l'ARN génomique du VHC .....	47
<b>4.</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>50</b>
4.1	Observation de séquences complémentaires permettant l'appariement entre le VHC 3'UTR VR et le NS5B.....	50
4.2	Cytomix permet une meilleure viabilité cellulaire et efficacité de transfection.....	51
4.3	Détermination de la fenêtre temporelle de production du VHC suite à la transfection des cellules Huh7.5.....	52
4.4	Comparaison des niveaux d'ARN viral des mutants vis-à-vis le virus original .....	54
<b>5.</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>64</b>

# Liste des tableaux

## Matériel et méthodes

Tableau 3.1 : Amorces utilisées pour la construction des mutants VHC.....	40
Tableau 3.2 : Liste des plasmides d'ADN utilisés pour les réactions de transcription, avec leur description et l'enzyme de restriction servant à la linéarisation.....	43
Tableau 3.3 : Séquences des amorces/sonde GAPDH.....	47

## Résultats

Tableau 4.1 : Comparaison de la structure duplexe VHC 3'UTR VR:NS5B chez le VHC de génotypes 1 et 2a .....	50
Tableau 4.2 : Effet de divers milieux de transfection sur la viabilité cellulaire et l'efficacité de transfection .....	51

# Liste des figures

## Introduction

Figure 1.1: Les événements historiques de la découverte du virus de l'hépatite C .....	2
Figure 1.2 : Arbre phylogénétique du virus de l'hépatite C .....	6
Figure 1.3: Diagramme simplifiée de la structure du virus de l'hépatite C.....	8
Figure 1.4: Le génome du VHC et les protéines virales avec leurs fonctions.....	10
Figure 1.5 : Structure de la polymérase NS5B du VHC.....	19
Figure 1.6 : Cycle de réplication du VHC.....	20
Figure 1.7 : Modèle de l'entrée du VHC .....	24
Figure 1.8 : Les structures retrouvées dans le 3'UTR et le 5'UTR de l'ARN génomique du VHC .....	29

## Matériel et méthodes

Figure 3.1 : Schéma des constructions VHC.....	41
Figure 3.2 : Organigramme des étapes méthodologiques.....	49

## Résultats

Figure 4.1 : Cinétique de production du VHC.....	53
Figure 4.2 : Les endroits mutés des régions 3'UTR-VR et NS5B du génome VHC et synthèse des ARNs génomiques.....	55
Figure 4.3 : Les niveaux comparatifs d'ARN viral des mutants VHC versus le VHC 1bwt au 9 <sup>ème</sup> jour.....	57

## Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AH2 :	$\alpha$ -hélice amphipathique
ApoE :	Apolipoprotein E
ARN :	Acide ribonucléique
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
ATP :	Adénosine triphosphate
CLDN1 :	Claudine-1
CRE :	Cis-acting replication element
CS :	Cassette
DGAT1 :	Diacylglycerol acyltransferase-1
DLS :	Dimerization linkage sequence
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS :	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
E.coli :	Escherichia coli
E1 :	Enveloppe glycoprotéine 1
E2 :	Enveloppe glycoprotéine 2
EDTA :	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
eIF :	Eukaryotic initiation factor
FBS :	Sérum bovin fœtal
GAPDH :	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GLU :	Glutathione
GTP :	Guanosine triphosphate
HVR1 :	Région hypervariable 1
IRES :	Internal ribosome entry site
kDa :	Kilodalton
LB :	Lysogeny broth
LDL :	Lipoprotéines de basse densité
LDs :	Gouttelettes lipidiques
miR :	Micro ARN
miR122 :	Micro-ARN 122
MTP :	Microsomal triglyceride transfer protein
NS :	Protéines non structurales
NTPase :	Nucleoside triphosphatases
NTR :	Non-translated region
OCLN :	Occludine
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
ORF :	Cadre de lecture ouvert
PCR :	Réaction en chaîne par polymérase
Poly (U/UC):	Région polyuridylée
PTB :	Polypyrimidine-tract-binding
RdRp :	RNA-dependent RNA polymerase
RE :	Réticulum endoplasmique
rpm :	Revolutions per minute
RT-qPCR :	Reverse transcription polymerase chain reaction

SL :	Stem Loop
SR-B1 :	Récepteur scavenger de classe B de type I
ssARN :	Single strand d'acide ribonucléique
TMH :	Hélice transmembranaire
UTR :	Untranslated region
VHC :	Virus de l'hépatite C
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL :	Lipoprotéines de très basse densité
WT :	Wild type
$\mu\text{F}$ :	Microfarad
$\mu\text{g}$ :	Microgramme
$\mu\text{l}$ :	Microlitre

# Remerciements

Ce mémoire est le résultat d'un travail de recherche de près de deux ans.

Au préalable, je veux dire merci à Dieu : ma source, ma force et mon soutien essentiel, Lui qui m'a permis de mener ces deux ans avec succès.

Ce travail est dédié à mon pays la Syrie, plus particulièrement à ma ville natale Alep en espérant le retour de la paix et la tranquillité. Toutes mes reconnaissances vont au Canada et au Québec, mon pays d'accueil, permettant la réalisation de mes ambitions et de ma carrière.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu échanger et qui m'ont aidée dans l'achèvement de ce travail :

Tout d'abord ma directrice de recherche Carolina Alfieri qui m'a donné confiance en moi-même et m'a permis de travailler dans son laboratoire. J'ai apprécié énormément son aide précieuse, sa patience et le temps qu'elle m'a consacré. Son accompagnement ne se résume pas seulement par ces quelques mots.

A Jerry, un très grand merci pour son expérience, son assistance et ses explications, qui ont contribué à alimenter ma réflexion et mon travail.

A Jing qui était plus qu'une grande sœur et une bonne amie : son partage quotidien va me manquer.

Je tiens à remercier aussi sincèrement les membres du Jury : Dr Guy Lemay et Dr Marc Drolet qui me font le grand honneur d'évaluer ce mémoire.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le support financier fourni par une Subvention à la Découverte provenant du Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG). Grâce à cet octroi j'ai pu bénéficier d'une bourse salariale qui m'a permis de me consacrer sereinement à l'élaboration de mon projet et à la rédaction de ce mémoire.

A la personne qui m'a encouragée et m'a appris le sens de l'ambition dans la vie, qui est avec moi à travers vents et marées, à l'homme de ma vie Edouard, j'offre toute ma gratitude.

Pour terminer, l'achèvement de ce travail n'aurait pas été possible sans l'accompagnement chaleureux de ma famille : Edgard, Sanaa et Samer. Tout particulièrement, je remercie ma belle-mère Fadia, qui m'a appuyée tout au long et m'a aidée sur le plan linguistique.



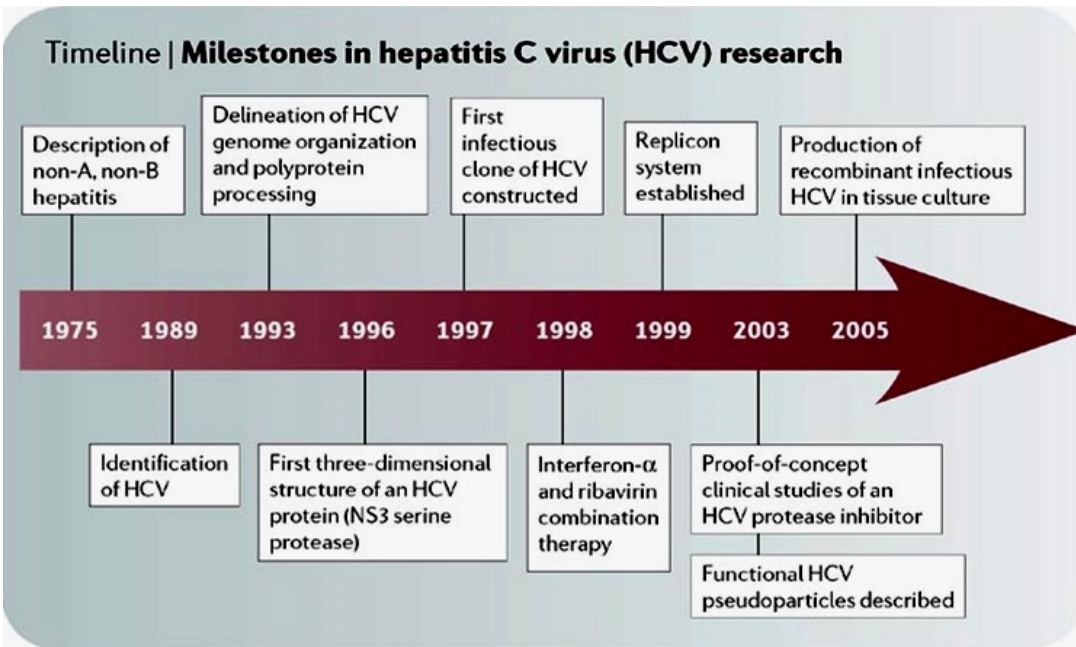
# 1. INTRODUCTION

## 1.1 L'hépatite C

### 1.1.1 Historique de l'hépatite C

Durant les années soixante-dix, un nouveau virus de l'hépatite a été reconnu chez les receveurs de transfusion sanguine, identifié comme hépatite non-A, non-B (Feinstone, Kapikian et al. 1975, Houghton 2009). Depuis, plusieurs recherches ont été faites afin d'identifier ce nouveau virus et développer un modèle cellulaire qui permet la réplication virale (Lohmann, Korner et al. 1999).

En 1987, Michael Houghton, Qui-Lim Choo et George Kuo ont collaboré avec le Dr. Daniel Bradley pour créer une technique de clonage moléculaire afin de séquencer le génome viral. En 1988, l'existence de ce virus a été confirmée par une vérification de sa présence chez un groupe de patients atteints d'hépatite non A non B, et en 1989 ils lui ont conféré le nom de virus de l'hépatite C (VHC) (Choo, Kuo et al. 1989, Kuo, Choo et al. 1989). L'infection au VHC a rapidement été reconnue comme une maladie silencieuse et pernicieuse. La Figure 1.1 montre la chronologie des étapes historiques et importantes de la découverte du virus de l'hépatite C.



**Figure 1.1:** Les événements historiques de la découverte du virus de l'hépatite C (Moradpour, Penin et al. 2007).

### 1.1.2 L'épidémiologie et la prévalence

Le virus de l'hépatite C est un problème de santé publique répandu mondialement. Selon les estimés, 170 - 210 millions de personnes, soit 3% de la population mondiale, sont touchées par l'infection VHC chronique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 3 à 4 millions de personnes sont nouvellement infectées chaque année et plus de 500 000 individus meurent annuellement de pathologies hépatiques liées au VHC (Lozano, Naghavi et al. 2012). Aussi, 0.6 à 0.7 % de la population canadienne vit avec l'hépatite C chronique en 2011 ; cependant 44 % de ces personnes n'ont pas reçu de diagnostic selon l'agence de la santé publique du Canada.

On rencontre l'hépatite C partout dans le monde. La prévalence varie considérablement d'une zone géographique à l'autre et à l'intérieur de la population évaluée. Selon l'estimation de l'OMS en 2016, les régions les plus touchées sont l'Afrique, l'Asie centrale et orientale et l'Europe orientale, alors que l'Amérique du Nord et l'Europe occidentale présentent la prévalence la plus faible (Cornberg, Razavi et al. 2011). Plus précisément, le Royaume-Uni et la Scandinavie possèdent les plus bas taux d'infection, soit de 0.01 à 0.1 %, tandis que les taux les plus élevés sont enregistrés en Égypte, où 15 à 20 % de la population est infectée (Frank, Mohamed et al. 2000, Alter 2007).

### **1.1.3 Les modes de transmission**

L'hépatite C se transmet par contact avec du sang infecté, et ce, 10 à 15 fois plus facilement que le VIH (Heintges and Wands 1997). Les comportements les plus dangereux en regard de la transmission sont ceux entourant le partage du matériel servant à la consommation de drogues injectables. Le risque de transmission par voie sexuelle a été considéré comme une voie relativement inefficace pour la transmission du VHC, mais la co-infection par le VIH peut potentiellement augmenter ce risque (Blackard, Shata et al. 2008). Le partage de matériel personnel contaminé par du sang infecté et les transfusions sanguines (10 % des cas de VHC) constituent également un risque de transmission. Toutefois, d'autres modes de transmission ont été décrits comme l'acupuncture, les piercings et les tatouages.

### **1.1.4 Les maladies associées**

Le VHC peut entraîner à la fois une infection hépatique aiguë et une infection chronique, dont la gravité est variable, pouvant aller d'une forme bénigne qui dure quelques semaines à une maladie grave qui s'installe à vie. La forme aiguë de la maladie est généralement asymptomatique dans 60 à 70 % des cas. Selon l'OMS, l'infection chez 55 à 85% des personnes infectées évoluera vers la forme chronique de la maladie, dont 20 à 30% des cas développeront une cirrhose, qui a le potentiel de se dégénérer en carcinome hépatocellulaire (Hoofnagle 1997).

## **1.2 Le virus de l'hépatite C**

### **1.2.1 Classification du virus de l'hépatite C**

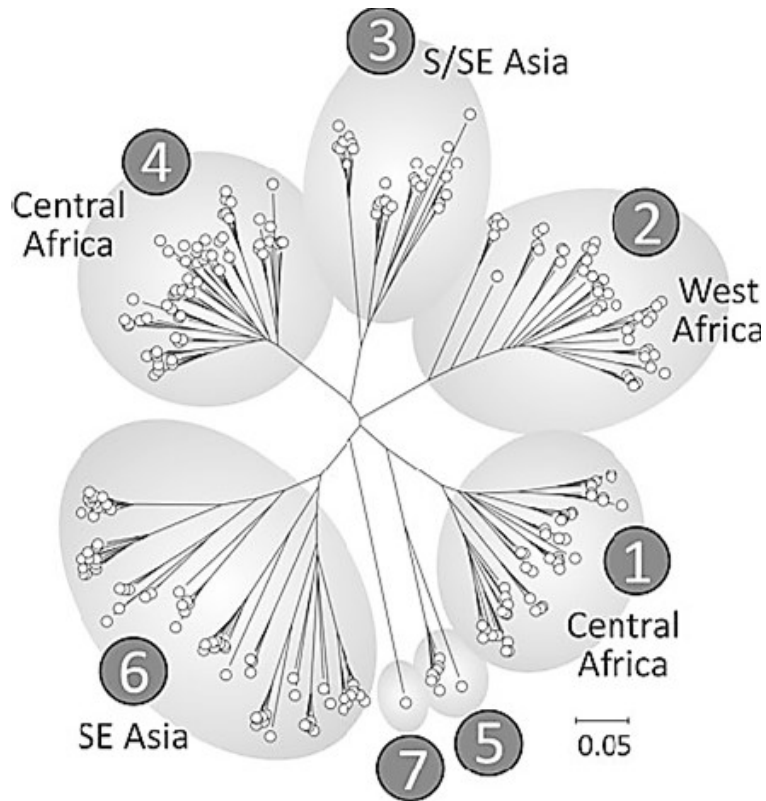
La famille des *Flaviviridae* regroupe les virus enveloppés à ARN positif simple brin répartis dans trois genres, notamment les flavivirus, pestivirus, et hepacivirus. Le VHC est classé parmi les hepacivirus (Farci 2002). Les membres de cette famille partagent des similarités par rapport à la morphologie du virion, l'organisation du génome viral et la stratégie de répllication.

### **1.2.2 Génotypes et sous-types**

En se basant sur une analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques, plusieurs génotypes et sous-types du VHC ont été identifiés. Les génotypes dérivent d'une hétérogénéité génétique au niveau des séquences nucléotidiques et sont numérotés d'après l'ordre de leur découverte. Les souches à l'intérieur de chacun des génotypes sont désignées comme des sous-

types. Le complexe des variantes génétiques retrouvées dans un isolat particulier est appelé la quasi-espèce. Après des années de recherche, ils ont pu identifier sept génotypes de VHC, désignés de 1 à 7, et plusieurs sous-types (environ 67) identifiés par des lettres minuscules (Smith, Bukh et al. 2014). Les génotypes se différencient à >30% au niveau des séquences nucléotidiques (Gottwein, Scheel et al. 2009). Les génotypes et sous-types ont une distribution géographique mondiale variable et leur prévalence relative varie d'une région géographique à l'autre (Figure 1.2).

Le génotype 1 est le plus répandu dans le monde et est associée au développement d'une infection chronique. Ce génotype est moins susceptible de répondre au traitement par l'interféron comparativement aux génotypes 2 et 3 (Zein 2000). En Amérique du Nord, les génotypes les plus fréquents sont les 1a et 1b, et en Amérique du Sud ce sont les 1a, 1b et 3a. Le génotype 3a est particulièrement répandue par voie intraveineuse chez les toxicomanes en Europe et aux États-Unis (Pawlotsky, Tsakiris et al. 1995). Le génotype 4 semble être répandue en Afrique du Nord et au Moyen-Orient (Simmonds, McOmish et al. 1993, Chamberlain, Adams et al. 1997), et les génotypes 5 et 6 semblent se limiter à l'Afrique du Sud et à Hong Kong, respectivement (Smith, Pathirana et al. 1997, Simmonds 2001). Le génotype 7, découvert en 2007, a été isolé au Canada à partir d'un immigrant de l'Afrique centrale (Messina, Humphreys et al. 2015). Il est toujours important de distinguer le génotype et le sous-type lors de la prise en charge d'un patient infecté, puisque chaque génotype répond différemment aux traitements disponibles.

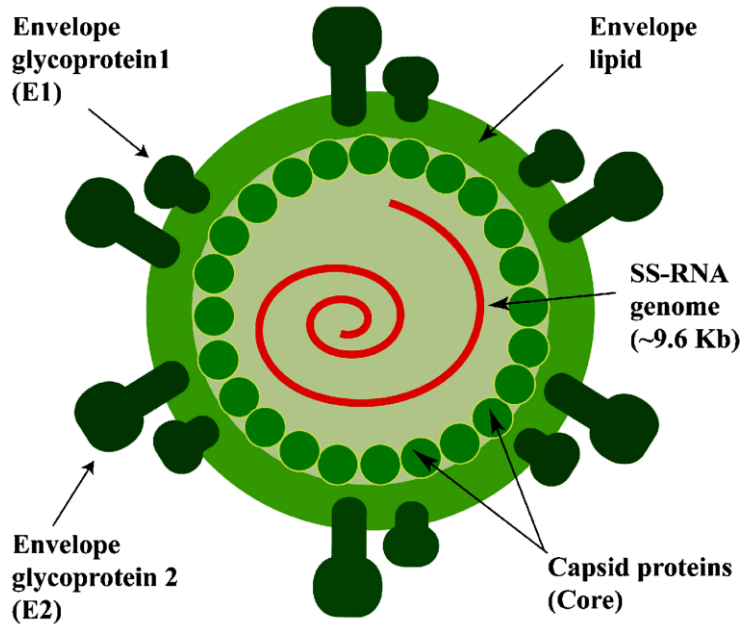


**Figure 1.2 : Arbre phylogénétique du virus de l’hépatite C** (Simmonds 2013). Cette topologie a été construite à partir d’une partie des séquences codantes de la protéine NS5B du virus de l’hépatite C des génotypes 1 à 7. Les branches majeures et mineures de l’arbre phylogénétique correspondent respectivement aux génotypes et aux sous-types du VHC. La figure représente aussi la diversité dans la distribution des génotypes et des sous-types pour chaque continent.

## 1.3 Caractéristiques générales du VHC

### 1.3.1 La structure

En termes de morphologie, le VHC, tout comme les autres membres de la famille des *Flaviviridae*, est constitué de trois structures (Figure 1.3); (1) une enveloppe lipidique provenant fort probablement du réticulum endoplasmique (RE), sur laquelle sont ancrées deux glycoprotéines, E1 et E2, organisées en complexes hétérodimériques non covalents (Cocquerel, Duvet et al. 1999); (2) une capsidie protéique de forme icosaédrique, formée par la polymérisation de la protéine Core; (3) le génome viral, constitué d'une molécule d'ARN simple brin mesurant 9,6 kb. Des études effectuées par filtration de sérums de chimpanzés à travers des membranes de polycarbonate ont permis de déterminer que la taille approximative de la nucléocapsidie du VHC varie entre 30 et 60 nm (He, Alling et al. 1987, Yuasa, Ishikawa et al. 1991, Chevaliez and Pawlotsky 2006).



**Figure 1.3: Diagramme simplifiée de la structure du virus de l'hépatite C (Sharma 2010).**

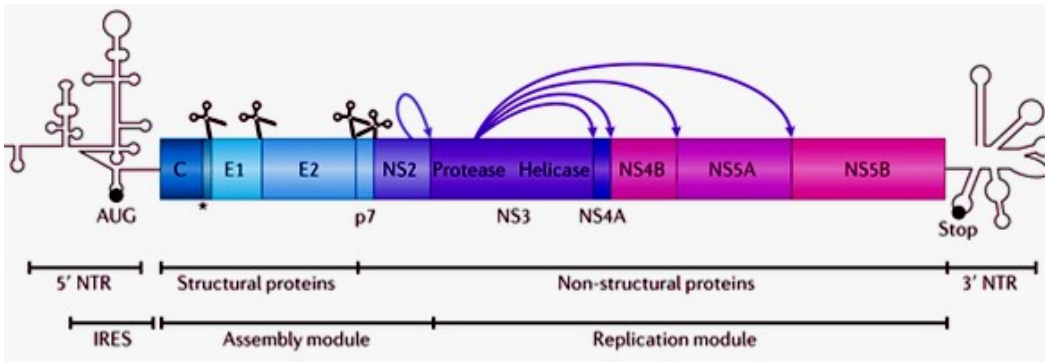
Le VHC est constitué d'une protéine Core qui interagit avec le ssARN génomique viral pour former la nucléocapside. E1 et E2 sont deux glycoprotéines de l'enveloppe associées à la membrane.

Le VHC circule sous diverses formes dans l'hôte infecté et s'associe à des lipoprotéines de basse densité (LDL) et à des lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les deux appartenant à la fraction infectieuse. D'autres particules virales sont liées à des immunoglobulines ou constituent des virions libres (Andre, Komurian-Pradel et al. 2002, Andre, Perlemuter et al. 2005, Moradpour, Penin et al. 2007).



### 1.3.2 Organisation du génome

Le génome des *Flaviviridae* est constitué d'une molécule d'ARN à brin positif, monocaténaire, linéaire, non segmenté d'une taille de 9,6 kb, avec un cadre de lecture ouvert (ORF) codant une polyprotéine de 3000 acides aminés (Choo, Kuo et al. 1989, Chevaliez and Pawlotsky 2006, Suzuki, Aizaki et al. 2007). Le génome est riche en G-C, et se retrouve sous forme très structurée dans le cytoplasme des cellules infectées et dans les particules virales. Le seul cadre ouvert de lecture est flanqué aux extrémités 5' et 3' par des régions non traduites (désignées UTR pour 'untranslated region' ou NTR pour 'non-translated region') hautement conservées (Figure 1.4). Le 5'UTR mesure 342 nucléotides (nt) et le 3'UTR mesure environ 225 nt (Yi and Lemon 2003). Ces deux extrémités du génome contiennent des éléments de contrôle de la traduction de la polyprotéine virale et de la réplication. Le précurseur est clivé en au moins dix protéines différentes, notamment les protéines structurales Core, E1 et E2, et les protéines non structurales P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (Figure 1.4).



**Figure 1.4: Le génome du VHC et les protéines virales avec leurs fonctions (adaptée par (Bartenschlager, Lohmann et al. 2013)).** Le génome du VHC et les protéines encodées : le cadre de lecture ouvert (ORF) codant les protéines structurales et non-structurales est flanqué par les régions 5' et 3' non-traduites. Les codons initiateur et terminal de l'ORF sont indiqués. Les ciseaux indiquent les sites de clivage de la polyprotéine par les peptidases cellulaires. L'astérisque indique le site de maturation en carboxy-terminal de la protéine Core, médiée par une peptidase signal- peptide. Les flèches réfèrent à un clivage par des protéases virales.

### 1.3.3 Protéines virales

Le cadre de lecture ouvert comporte 9024 à 9111 nucléotides. Ce chiffre varie selon le génotype. Un processus de maturation co- et post-traductionnelle permet le clivage de la polyprotéine pour donner naissance à des protéines structurales (Core et les protéines d'enveloppe E1 et E2) et les protéines non structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) sous l'action combinée de protéases cellulaires et virales.

### 1.3.3.1 Protéines structurales

#### La protéine Core

La protéine de la capsid virale Core est très conservée d'une souche virale à l'autre et fortement antigénique. Elle est la première protéine structurale alignée sur le cadre ouvert de lecture et sert essentiellement à la formation de la capsid par polymérisation. Elle est clivée au niveau d'une séquence signal interne située entre Core et E1. Core interagit directement avec de nombreuses protéines cellulaires qui jouent probablement un rôle dans la modulation de ses fonctions incluant sa capacité à s'assembler (McLauchlan 2000, Klein, Dellos et al. 2005).

Cette protéine possède deux hélices hydrophiles et un domaine hydrophobe (Boulant, Vanbelle et al. 2005). Le domaine hydrophile N-terminal (D1) est essentiel à la liaison de l'ARN et à l'oligomérisation, un phénomène important dans l'assemblage du virion (Klein, Dellos et al. 2005). D1 est également impliquée dans les interactions avec de nombreux facteurs cellulaires (de Chasse, Navratil et al. 2008) et peut ainsi contribuer à des altérations des fonctions de la cellule hôte lors d'une infection par le VHC. À l'aide du domaine hydrophobe C-terminal (D2), Core se localise sur la surface des gouttelettes lipidiques (LDs) sur les membranes du RE chez la cellule infectée (McLauchlan, Lemberg et al. 2002, Boulant, Montserret et al. 2006). L'association de Core avec les LDs (Boulant, Targett-Adams et al. 2007, Miyanari, Atsuzawa et al. 2007) et l'interaction avec NS5A (Masaki, Suzuki et al. 2008) jouent plusieurs rôles essentiels dans l'assemblage de la nucléocapsid. Core est aussi impliquée dans l'évasion du système immunitaire, la signalisation cellulaire, la transcription et l'apoptose (McLauchlan 2000, Tellinghuisen and Rice 2002).

## **Les glycoprotéines E1 et E2**

Les glycoprotéines E1 et E2 font partie de l'enveloppe virale et sont impliquées dans la neutralisation du virus (Voisset and Dubuisson 2004). Elles ont des masses moléculaires de 33-35 et 70-72 kDa, respectivement, ce qui correspond à 192 acides aminés pour E1 et 363 acides aminés pour E2. Ils s'assemblent dans le RE sous forme d'hétérodimères non covalents (Deleersnyder, Pillez et al. 1997, Op De Beeck, Voisset et al. 2004). Ces glycoprotéines sont des protéines transmembranaires de type I et sont composées d'un ectodomaine N-terminal et d'une région hydrophobe C-terminal d'ancrage dans les membranes. Les 27 acides aminés N-terminaux d'E2 constituent la région hypervariable 1 (HVR1) avec un rôle probable dans l'entrée du virus permettant à celui-ci d'échapper au système immunitaire (von Hahn, Yoon et al. 2007). Ainsi, E2 joue un rôle crucial dans les premières étapes de l'infection. En outre, il s'agit du ligand majeur qui se lie au CD81 et au SR-B1 (récepteur éboueur classe B de type I), deux des multiples récepteurs cellulaires identifiés du VHC (Pileri, Uematsu et al. 1998, Scarselli, Ansuini et al. 2002). La protéine E1 semble être impliquée dans le processus de fusion membranaire nécessaire à l'internalisation du virus dans la cellule cible (Lavillette, Pecheur et al. 2007).

### **1.3.3.2 Protéines non structurales**

Les protéines non structurales (NS) ne sont pas incorporées dans la particule virale mais elles sont impliquées dans le cycle viral, et surtout dans la réplication du génome du VHC (Voisset and Dubuisson 2004). Ainsi, il s'agit de cofacteurs qui aident à déclencher la fabrication de

nouveaux virions. Il y a sept protéines NS : la viroporine p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B.

### **La viroporine p7 (canal ionique à Ca<sup>2+</sup>)**

La viroporine p7 est une petite protéine membranaire intégrale de 63 acides aminés (Carrere-Kremer, Montpellier-Pala et al. 2002) qui est encodée à la jonction de la région structurale et non structurale du cadre de lecture ouvert du génome VHC (Steinmann and Pietschmann 2010). Elle comporte deux  $\alpha$ -hélices transmembranaires connectées par une boucle cytosolique chargée positivement, tandis que les extrémités N et C terminales sont orientées vers la lumière du RE (Carrere-Kremer, Montpellier-Pala et al. 2002). Récemment, une structure tridimensionnelle du complexe hexamérique de p7 a été mise en évidence par microscopie électronique (Luik, Chew et al. 2009).

La p7 est une petite protéine hydrophobe dispensable à la réplication de l'ARN viral, mais essentielle pour la production de virus infectieux *in vivo* et *in vitro*, suggérant un rôle potentiel de cette protéine dans l'assemblage et la libération du virus (Steinmann and Pietschmann 2010, Madan and Bartenschlager 2015). P7 a deux fonctions, notamment 1) participer à l'élaboration de particules virales par la médiation de l'interaction entre les glycoprotéines de l'enveloppe et NS2, et 2) former un canal afin de réguler l'étape de maturation intracellulaire des particules VHC afin de les rendre pH résistantes et infectieuses (Madan and Bartenschlager 2015).

### **La protéine NS2**

Il s'agit d'une protéine transmembranaire non glycosylée de 23 kDa laquelle s'associe avec NS3 pour former une protéase auto-catalytique. La partie N-terminale de NS2 est

essentielle pour la production de virus infectieux, probablement à cause de son rôle dans la morphogénèse du VHC (Jones, Murray et al. 2007). Son activité catalytique réside dans la partie C-terminale (Hijikata, Mizushima et al. 1993). Le bout N-terminal contient trois segments transmembranaires putatifs (Jirasko, Montserret et al. 2008, Jirasko, Montserret et al. 2010). La protéine NS2 est phosphorylée par la protéine kinase CK2 et ciblée au protéasome pour la dégradation (Franck, Le Seyec et al. 2005). NS2 n'est pas requise pour la réplication de l'ARN viral, mais elle est essentielle pour la production de virus infectieux in vitro (Pietschmann, Kaul et al. 2006, Jones, Murray et al. 2007, Jirasko, Montserret et al. 2008). Le clivage au niveau de la jonction NS2/ NS3 est essentiel pour libérer la forme fonctionnelle de la protéine NS3, et conséquemment favoriser la réplication de l'ARN viral. NS2 joue un rôle crucial dans l'assemblage de différents composants viraux qui sont essentiels pour la formation des particules virales du VHC (Stapleford and Lindenbach 2011). Une étude récente (Popescu, Callens et al. 2011) a démontré la présence d'interactions moléculaires entre les protéines NS2, p7 et E2, ainsi qu'une interaction physique entre NS2 et p7.

### **La protéase NS3/4A**

NS3 est une protéine hydrophile multifonctionnelle de 69 kDa avec un domaine sérine protéase dans le tiers N-terminal et un domaine NTPase/hélicase dans les deux tiers C-terminal (Yao, Reichert et al. 1999). L'activité sérine protéase de l'hétérodimère formé par NS3 et NS4A assure le clivage des protéines situées en aval. La région centrale de NS4A contient 54 acides aminés de la protéine membranaire et agit comme cofacteur de l'activité sérine-protéase du NS3 (Kwong, Kim et al. 1998), permettant ainsi sa stabilisation, sa localisation à la membrane du RE, ainsi que l'activation du clivage, en particulier à la jonction NS4B/NS5A (Bartenschlager,

Lohmann et al. 1995, Lin, Thomson et al. 1995). La région centrale (21-34 acides aminés) de NS4A est hydrophobe, et nécessaire pour l'activation de NS3 (Bartenschlager, Ahlborn-Laaake et al. 1994, Lin, Thomson et al. 1995).

L'activité hélicase couplée à une activité NTPase est essentielle pour la traduction et la réplication du génome viral. L'hydrolyse de nucléosides triphosphates fournirait l'énergie nécessaire à l'hélicase pour « casser » les structures secondaires et séparer les brins positifs et négatifs de l'ARN du VHC lors de la réplication, permettant ainsi l'accès du génome viral aux enzymes virales et cellulaires (Tai, Chi et al. 1996, Tackett, Wei et al. 2001).

En plus de son rôle potentiel dans la résolution de structures secondaires lors de la réplication de l'ARN, le domaine hélicase NS3 semble être impliqué dans une première étape de l'assemblage viral (Ma, Yates et al. 2008) indépendamment de ses fonctions enzymatiques (Ma, Anantpadma et al. 2011). À part son rôle essentiel dans la réplication, la protéase NS3-4A joue un rôle dans la persistance et la pathogenèse du VHC (Morikawa, Lange et al. 2011). Deux inhibiteurs de la protéase NS3-4A de première génération, telaprevir and boceprevir, ont été approuvés récemment pour le traitement de l'hépatite C chronique (Pawlotsky 2013).

### **La protéine NS4B**

NS4B est une protéine hydrophobe de 27 kD a relativement peu caractérisée. Pendant longtemps, elle fut désignée comme protéine de fonction inconnue. Cette protéine comporte des domaines N- et C-terminaux situés sur le bord cytosolique de la membrane du RE, et quatre segments transmembranaires dans sa partie centrale (Blight 2011). Son extrémité N-terminale contient une  $\alpha$ -hélice amphipathique prédite (AH1, dans les premiers 27 acides aminés de la

protéine NS4B) et une  $\alpha$ -hélice amphipathique associée à la membrane (AH2, couvrant les acides aminés 42 à 66) (Gouttenoire, Castet et al. 2009). AH2 joue un rôle important dans la réplication de l'ARN du VHC (Bryson, Cho et al. 2010, Cho, Dvory-Sobol et al. 2010). Le domaine N-terminal de NS4B interagit avec d'autres protéines non structurales virales (Lundin, Lindstrom et al. 2006) et a la capacité de lier l'ARN viral. La partie C-terminale comprend une  $\alpha$ -hélice amphipathique hautement conservée (H1, couvrant les acides aminés 201 à 212) et une deuxième  $\alpha$ -hélice amphipathique associée à la membrane (H2, couvrant les acides aminés 228 à 253) (Gouttenoire, Montserret et al. 2009), ainsi que deux sites de palmitoylation à l'extrémité (Yu, Lee et al. 2006).

En outre, NS4B est impliqué dans l'assemblage des particules virales (Jones, Patel et al. 2009, Gouttenoire, Penin et al. 2010) et dans la modulation de l'ARN polymérase, des voies de signalisation de l'hôte, de la carcinogénèse, du fonctionnement du réticulum endoplasmique et de la traduction (Sklan and Glenn 2006). NS4B est également responsable de la formation d'un réseau membranaire (Egger, Wolk et al. 2002, Sklan and Glenn 2006). Pris ensemble, les résultats d'études biochimiques, structurelles et génétiques indiquent que NS4B est un organisateur maître de la formation du complexe de réplication du VHC. Il n'est donc pas surprenant que NS4B soit également activement poursuivie comme cible antivirale (Rai and Deval 2011).

### **La protéine NS5A**

NS5A est une phosphoprotéine de 447 acides aminés associée à la membrane et principalement localisée dans les compartiments cytoplasmiques périnucléaires de la cellule, y



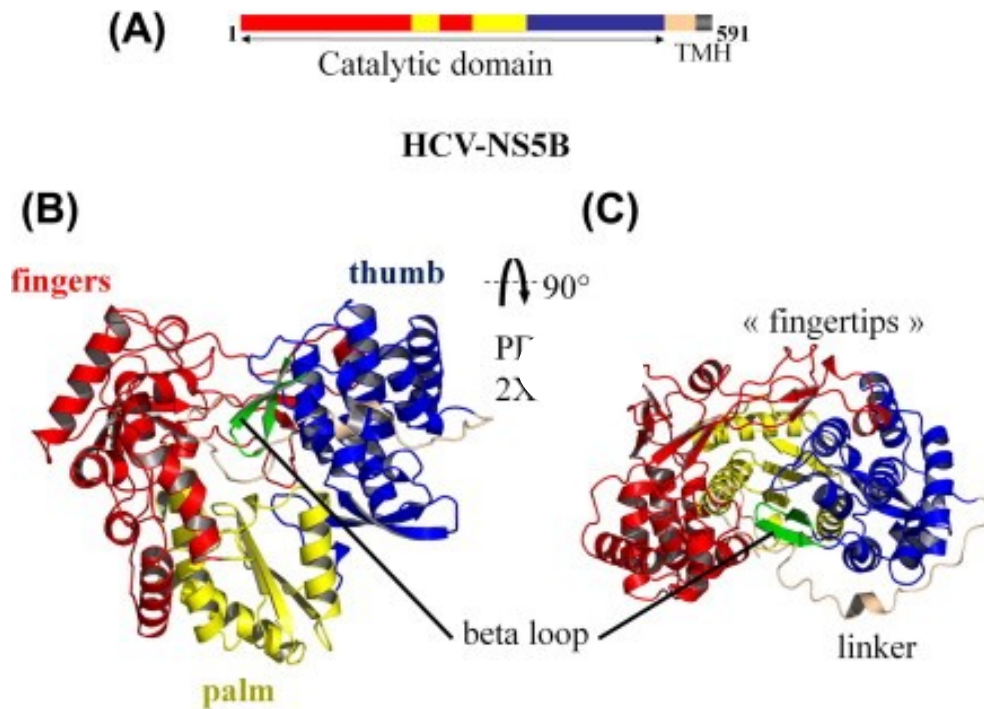
compris le RE et l'appareil de Golgi (Ide, Zhang et al. 1996, Polyak, Paschal et al. 1999). Elle joue de multiples rôles dans la modulation de la réplication de l'ARN du VHC, dans les interactions du VHC avec la cellule cible, et dans la pathogenèse virale (He, Staschke et al. 2006). La protéine NS5A a la capacité de moduler la réponse cellulaire à l'interféron (Tan and Katze 2001, Gale and Foy 2005, He, Staschke et al. 2006). NS5A a deux formes phosphorylées, P56 et P58, qui diffèrent dans leur mobilité électrophorétique (Macdonald and Harris 2004). P56 est essentiellement phosphorylée par la protéine kinase de l'hôte cellulaire au centre et à proximité de l'extrémité C-terminale, alors que P58 est une forme hyper phosphorylée de NS5A au centre de la région riche en serine (Kaneko, Tanji et al. 1994, Tanji, Kaneko et al. 1995, Reed, Xu et al. 1997). NS5A a trois domaines structurellement différents. Le domaine I, situé dans la région N-terminale, possède une structure dimérique probablement impliquée dans l'interaction avec l'ARN ou avec les protéines cellulaires et virales (Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2005). Ce domaine aussi permet la localisation de la protéine au niveau des gouttelettes lipidiques (Miyanari, Atsuzawa et al. 2007). Le domaine II, situé dans la région C-terminale, est principalement impliqué avec le domaine I dans la réplication de l'ARN (Tanji, Kaneko et al. 1995). Le domaine III, situé dans la région C-terminal aussi, est important pour l'assemblage et la production de particules infectieuses (Appel, Zayas et al. 2008) et impliqué dans l'interaction avec la protéine Core (Masaki, Suzuki et al. 2008).

### **La polymérase NS5B**

NS5B est l'ARN polymérase ARN dépendante virale (RdRp), une phosphoprotéine de 68 kDa associée à la membrane (Behrens, Tomei et al. 1996, Simister, Schmitt et al. 2009). Ainsi, cette protéine est essentielle à la réplication de l'ARN viral (Moradpour, Penin et al. 2007, Jin,

Leveque et al. 2012). NS5Ba une structure cristalline 3D classique (Figure 1.5), dite «main droite», avec un domaine pouce, un domaine paume et un domaine doigt dans le site catalytique, qui forment ensemble un tunnel par lequel l'ARN simple brin est amené au site actif (Ago, Adachi et al. 1999, Bressanelli, Tomei et al. 1999, Lesburg, Cable et al. 1999). La partie C-terminale est responsable de l'attachement à la membrane du RE. Cet ancrage est superflu pour l'activité de polymérase in vitro, mais indispensable pour la réplication de l'ARN dans les cellules (Yamashita, Kaneko et al. 1998, Moradpour, Brass et al. 2004); en plus elle joue un rôle direct dans la synthèse de l'ARN (Lee, Shin et al. 2004). Cette protéine constitue une partie intégrale du projet. Ses fonctions et sa structure seront présentées en détail plus loin dans l'Introduction.

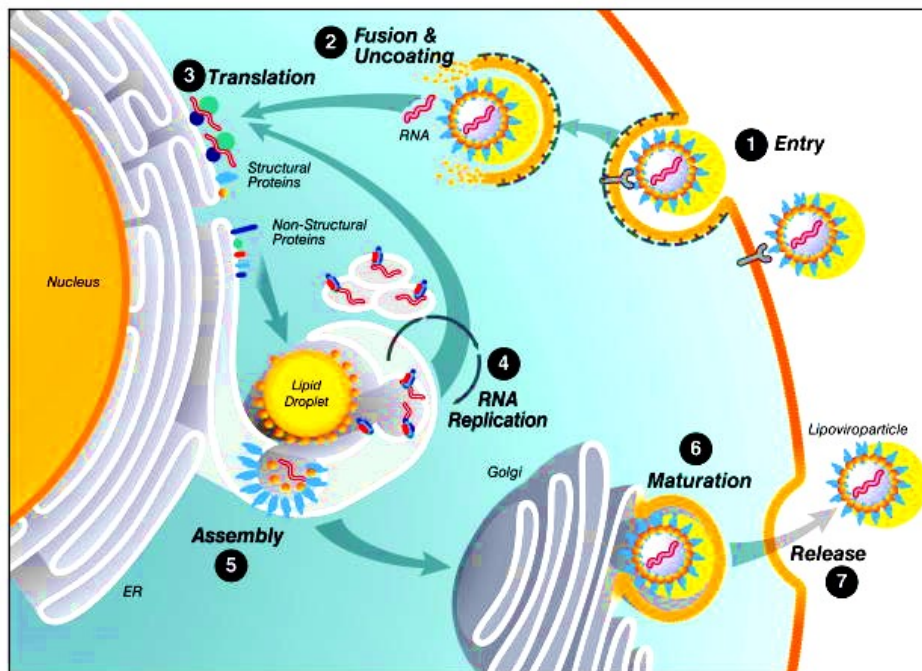
Parmi les protéines non-structurales, la sérine protéase NS3-4A et la RdRp NS5B sont généralement considérées comme étant les cibles les plus attrayantes pour la conception de nouveaux médicaments anti-VHC par voie orale.



**Figure 1.5 : Structure de la polymérase NS5B du VHC (adaptée de (Caillet-Saguy, Lim et al. 2014)).** (A) La structure primaire montre l'organisation en domaine catalytique et hélice transmembranaire (TMH) reliés par le connecteur (Linker). (B) et (C) sont deux vues en rubans à des orientations séparées par  $90^\circ$  l'une de l'autre, colorées par sous-domaines avec la même convention que dans le panneau A. La structure (B) est dans une vue de face et (C) est de dessus. Le ruban rouge indique le domaine doigts, le bleu indique le pouce et le jaune indique la paume. La boucle bêta dans le domaine du pouce spécifique des polymérases de *Flaviviridae* est colorée en vert et indiquée. L'extrémité des doigts (fingertips), qui vient solidariser doigts et pouce à l'arrière de l'enzyme, ne laissant qu'un étroit tunnel pour l'accès au site actif des nucléotides entrants.

## 1.4 Le cycle viral du VHC

Le cycle viral du VHC comporte l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule hôte, la décapsidation, les étapes de traduction et réplication, et enfin, l'assemblage et le relâche des virions. Ces étapes sont résumées dans la Figure 1.6.



**Figure 1.6 : Cycle de réplication du VHC (Herker and Ott 2011).** (1) La liaison du virus et l'intériorisation grâce à différents récepteurs; (2) la fusion et la décapsidation permettant le relâche de l'ARN viral dans le cytoplasme cellulaire; (3) la médiation de l'IRES (internal ribosome entry site) dans la traduction et le traitement de la polyprotéine; (4) la réplication de l'ARN viral; (5) l'assemblage; (6) la maturation; et (7) la libération des nouvelles particules virales.

### 1.4.1 L'attachement et l'entrée du virus (Figure 1.7)

Lors d'une infection primaire, les particules VHC sont transportées au foie par le courant sanguin. Elles s'attachent aux hépatocytes à l'aide de ligands viraux et de récepteurs sur la surface des cellules cibles. Les premières études sur ce sujet ont rapporté que les glycoprotéines virales étaient responsables de la liaison du virus à des protéoglycanes sulfate d'héparane ou au SRB1 (scavenger receptor class B type-1) (Scarselli, Ansuini et al. 2002, Barth, Schafer et al. 2003). Des études plus récentes ont précisé que la fixation initiale des particules VHC à des hépatocytes est médiée par les protéoglycanes sulfate d'héparane syndécane-1 ou syndécane-4 (Shi, Jiang et al. 2013, Lefevre, Felmlee et al. 2014) ou par le récepteur SRB1 (Dao Thi, Granier et al. 2012) selon la densité du virion. D'autres données récentes suggèrent que l'ApoE (Apolipoprotein E), plutôt que les glycoprotéines du VHC, pourrait être impliquée dans ce premier contact (Jiang, Wu et al. 2013). En raison de l'interaction des particules VHC avec les lipoprotéines, le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLR) a également été proposé de jouer un rôle dans la phase précoce de l'entrée du VHC (Agnello, Abel et al. 1999). Cependant, l'interaction VHC-LDLR semble être impliquée dans une voie d'entrée non-productive qui peut potentiellement conduire à une dégradation de la particule virale (Albecka, Belouzard et al. 2012).

Suite à l'attachement initial à la surface de l'hépatocyte, les étapes suivantes de l'entrée du VHC sont moins bien connues. Plusieurs études ont rapporté qu'une série de facteurs spécifiques est impliquée, dont la tétraspannine CD81 (Pileri, Uematsu et al. 1998), le SRB1 (Scarselli, Ansuini et al. 2002) et les protéines de la jonction serrée, notamment la claudine-1 (CLDN1) (Evans, von Hahn et al. 2007) et l'occludine (OCLN) (Ploss, Evans et al. 2009).

**CD81** est une molécule de 25 kDa de la famille des tétraspennines exprimée à la surface cellulaire. Elle joue un rôle clé dans le cycle de vie du VHC (Feneant, Levy et al. 2014). La CD81 est enrichie dans les zones membranaires formant des plates-formes stables, lesquelles sont en échange dynamique avec le reste de la membrane plasmique (Harris, Clerte et al. 2013, Potel, Rassam et al. 2013). La CD81 a une petite et une grande boucle extracellulaire. La grande boucle est variable, sauf entre les humains et les chimpanzés, les deux seules espèces permissives à l'infection par le VHC (Walker 1997, Major, Dahari et al. 2004). Cette boucle est impliquée dans l'attachement du VHC par sa glycoprotéine d'enveloppe E2 (Pileri, Uematsu et al. 1998, Flint, Thomas et al. 1999, Petracca, Falugi et al. 2000). En outre, la CD81 interagit avec la CLDN1 (Harris, Davis et al. 2010) pour former un complexe co-récepteur impliqué dans les événements ultérieurs (Farquhar, Hu et al. 2012).

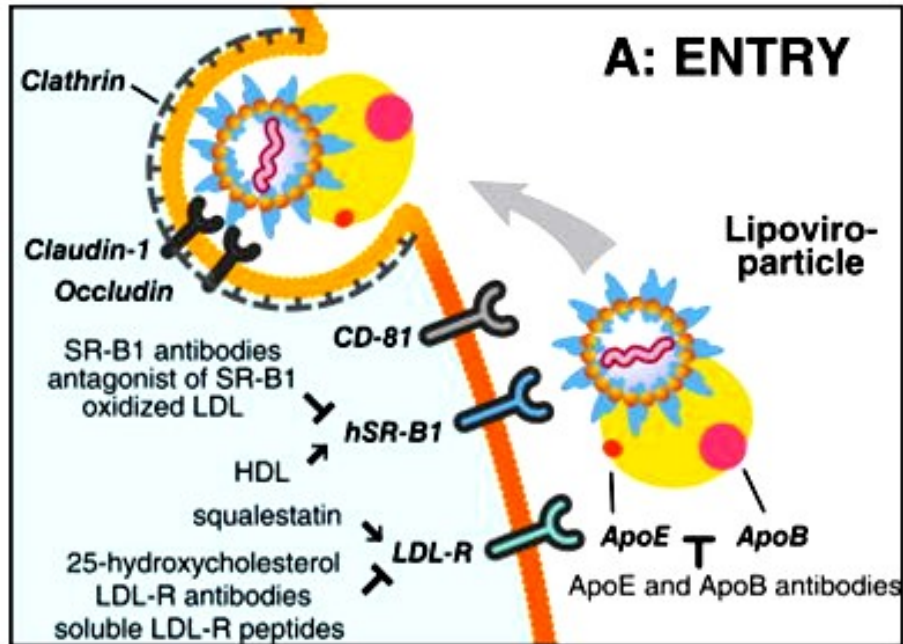
**SRB1 (récepteur humain scavenger de classe B type I)** a été identifié comme un autre récepteur putatif pour le VHC. Le SRB1 est une glycoprotéine de 82 kDa, contenant une grande boucle extracellulaire ancrée dans la membrane plasmique aux deux extrémités N- et C-terminales au moyen de domaines transmembranaires (Krieger 2001). Il s'agit d'un récepteur «multi-ligand» qui lie les différentes classes de lipoprotéines et ainsi régule l'alimentation du cholestérol dans la cellule par sa fonction de transfert lipidique bidirectionnelle (Connelly and Williams 2004). Le SRB1 pourrait être un facteur de première entrée, coopérant avec le virion après sa fixation initiale à la cellule. Le rôle du SRB1 dans l'entrée du VHC a été suggéré par sa capacité de faciliter la liaison d'E2 et la région hypervariable 1 (HVR1) d'E2 qui est indispensable pour cette interaction (Scarselli, Ansuini et al. 2002). SRB1 contribue aussi à la fixation du VHC à travers l'interaction avec les lipoprotéines associées au virus (Maillard, Huby et al. 2006, Dao Thi, Granier et al. 2012).

Le virus est ensuite relocalisé vers les jonctions cellulaires où sont localisées les protéines CLDN1 et OCLN qui sont critiques pour l'entrée du VHC dans les cellules hépatiques et agissent lors des dernières étapes de l'entrée virale. Ces petites protéines contiennent deux boucles extracellulaires, trois domaines intracellulaires et quatre séquences transmembranaires (Furuse and Tsukita 2006).

**CLDN1** est une protéine essentielle à l'étape tardive de l'entrée du VHC (Evans, von Hahn et al. 2007). Cette protéine est nécessaire à l'infection par le VHC de lignées cellulaires d'hépatome humain. Il fut démontré que CLDN1 est capable de conférer une sensibilité au VHC lorsqu'exprimée ectopiquement dans des cellules non hépatiques (Evans, von Hahn et al. 2007).

**OCLN** est essentielle à l'entrée de VHC (Ploss, Evans et al. 2009). Cette protéine a quatre domaines transmembranaires présents dans le complexe des jonctions serrées des cellules épithéliales polarisées, où sa fonction est de réguler la perméabilité paracellulaire et l'adhérence cellulaire (Paris, Tonutti et al. 2008).

Une fois attaché à la surface cellulaire, le virus entre dans la cellule via le processus d'endocytose dépendante de la clathrine (Blanchard, Belouzard et al. 2006). Après l'internalisation, le virion transite par les endosomes à l'aide de fusion membranaire à bas pH (Tscherne, Jones et al. 2006) et la capsid est relâchée dans le cytosol. La décapsidation enchaîne et l'ARN viral est libéré dans le cytosol afin d'être traduit et répliqué.



**Figure 1.7 : Modèle de l'entrée du VHC (adaptée de (Herker and Ott 2011)).** Après la fixation des lipoviro-particules aux LDLR et SRB1, le virus se lie au CD81 et ensuite à la claudine-1 et à occludine, qui facilitent les dernières étapes de l'entrée virale.

### 1.4.2 La traduction (Figure 1.6, étape 3)

Le VHC, comme tous les virus appartenant à la famille des *Flaviviridae*, est doté d'un génome d'ARN à brin positif qui sert de matrice pour la traduction (Niepmann 2013). Les régions non traduites (UTRs) contiennent des éléments d'ARN très structurés qui sont critiques pour la traduction et la réplication du génome du VHC (Lohmann 2013). La région 5'UTR ainsi que les premiers nucléotides de la région codant pour la protéine Core constituent le site d'entrée ribosomique interne (IRES) servant à l'initiation de la traduction du génome viral en une seule polyprotéine en l'absence d'une structure coiffée. L'IRES forme un complexe stable de pré-initiation à l'aide d'une liaison directe du sous-unité ribosomale 40S sans avoir besoin de



facteurs d'initiation de la traduction canonique(Otto, Lukavsky et al. 2002). Ensuite, le complexe IRES-40S interagit avec le facteur d'initiation de la traduction(eIF3) et le complexe ternaire ARN<sup>t</sup>iMet (ternary Met-transfer RNA)-eIF2-GTP pour former une particule 48S-IRES(Ji, Fraser et al. 2004). Lors de l'hydrolyse du GTP, eIF2 libère l'initiateur ARN<sup>t</sup> et se dissocie du complexe. Une deuxième étape d'hydrolyse du GTP impliquant le facteur d'initiation eIF5B permet l'association de la sous-unité 60S ribosomique, formant ainsi un complexe IRES-80S fonctionnel qui amorce la synthèse de la polyprotéine virale (Ji, Fraser et al. 2004, Otto and Puglisi 2004).

Un micro-ARN (miR122), exprimé exclusivement dans les cellules hépatiques, a été rapporté pour son rôle important dans la régulation à la hausse de la réplication du VHC (Henke, Goergen et al. 2008). Le miR122 serait capable de réguler la réplication du VHC en modulant la liaison des protéines cellulaires à l'ARN viral et en contrôlant l'équilibre entre l'engagement de l'ARN pour la traduction de la polyprotéine par rapport à la synthèse de l'ARN viral (Masaki, Arend et al. 2015).

### **1.4.3 La réplication (Figure 1.6, étape 4)**

Lors de la traduction, les protéines du VHC s'associent aux membranes du RE. L'infection conduit à des réarrangements des membranes intracellulaires, une condition préalable à la formation d'un complexe de réplication qui associe des protéines virales, des composants cellulaires et des brins d'ARN naissants(Chevaliez and Pawlotsky 2006). Les protéines NS4B et NS5A du HCV semblent suffisantes pour induire la formation d'un réseau membranaire (membranous web) constituée de petites vésicules noyées dans une matrice membranaire

formant un complexe multiprotéique qui contient toutes les protéines non structurales du VHC (Egger, Wolk et al. 2002, Suzuki, Ishii et al. 2007). Le RdRp, notamment NS5B, est la plus importante des protéines du complexe de réplication (Lesburg, Cable et al. 1999).

Les mécanismes impliqués dans les étapes de réplication du VHC sont encore mal compris. Comme avec d'autres virus à ARN à brin positif, la réplication du VHC débute par la synthèse d'un brin ARN négatif complémentaire qui se sert du génome comme gabarit. Ensuite, le brin négatif devient le gabarit pour la synthèse de nombreuses copies de polarité positive lesquelles sont ensuite utilisées pour la traduction de la polyprotéine et la synthèse de nouveaux intermédiaires de réplication ou pour l'emballage dans de nouvelles particules virales (Bartenschlager, Frese et al. 2004). La RdRp catalyse la synthèse des brins négatifs et des brins positifs, malgré que les brins d'ARN positifs sont transcrits préférentiellement, et sont alors plus abondants de 5 à 10 fois comparé aux brins d'ARN négatifs (Suzuki, Ishii et al. 2007).

La réplication de l'ARN viral est déclenchée par une interaction entre les protéines du complexe de réplication, la région X-tail de la 3'UTR et la tige-boucle 5BSL3.2 de l'ARN du NS5B, cette dernière formant une structure 'pseudonoed' avec une tige-boucle située dans la 3'UTR (You, Stump et al. 2004, Friebe, Boudet et al. 2005). La polypyrimidine-tract-binding protein (PTB) est une protéine trouvée dans la fraction membranaire et associée au complexe de réplication. Sa forme phosphorylée est probablement nécessaire pour une réplication efficace de l'ARN du VHC (Chang and Luo 2006). Cette protéine participe à la synthèse de l'ARN viral, moyennant sa liaison à l'ARN du VHC. Elle est aussi impliquée à plusieurs niveaux dans la modulation de la traduction de l'ARN viral (Ali and Siddiqui 1995, Ito and Lai 1997, Ito and Lai 1999, Aizaki, Choi et al. 2006).

#### **1.4.4 L'assemblage et la relâche des virions (Figure 1.6, étapes 5-6-7)**

Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de visualiser les sites d'assemblage du VHC, donc il nous manque beaucoup de connaissances sur les différentes étapes de ce processus.

L'initiation de l'assemblage des virions exige la libération de nouveaux brins d'ARN (+) de la toile membranaire. Ces brins se dirigent, avec l'aide la phosphoprotéine NS5A, vers la protéine Core qui forme la capsid du virion (Masaki, Suzuki et al. 2008). La protéine Core est située sur le bord cytosolique de la membrane du RE ; ainsi l'assemblage s'initie dans le cytosol. La maturation et la libération des virions se produit par un transfert des particules naissantes aux membranes du RE pour permettre l'accès aux voies sécrétoires des hépatocytes. Ainsi, la production de VHC infectieux entraîne d'abord une phase d'initiation, qui se produit sur les parois cytosolique des membranes du RE permettant l'assemblage avec les gouttelettes lipidiques - LDs, suivie par l'interaction avec des facteurs viraux, et enfin la maturation et la libération des virions dans le lumen des membranes du RE pour engager les lipoprotéines de très basse densité (VLDL).

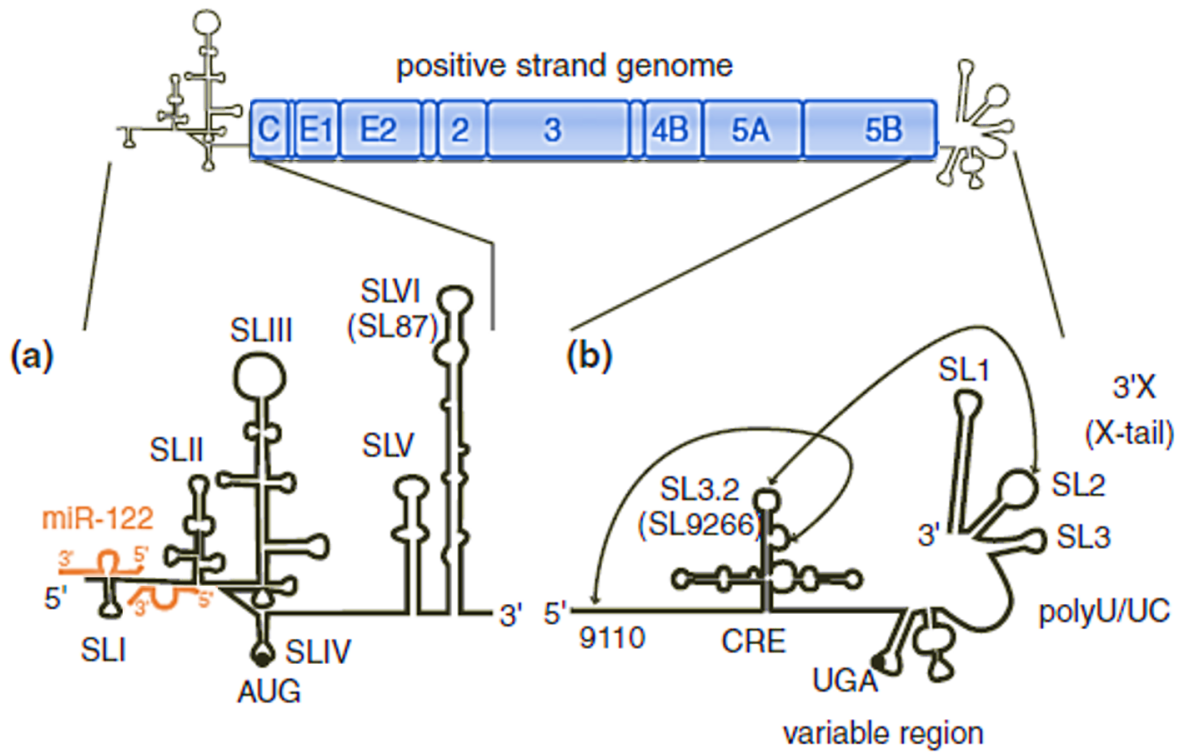
L'assemblage commence à proximité de LDs cytosoliques (Miyanari, Atsuzawa et al. 2007) et comprend une encapsidation de l'ARN génomique suivie par l'acquisition d'une enveloppe membranaire par bourgeonnement dans la lumière du RE (Gastaminza, Cheng et al. 2008). La sécrétion des particules de VHC entraîne des mécanismes responsables de la formation de VLDL (Bartenschlager, Penin et al. 2011). Les LDs et les VLDL sont des contributeurs majeurs de la cellule hôte à l'assemblage des virions du VHC, un processus qui dépend d'une interaction non seulement avec des LDs, mais aussi avec les membranes du RE entourant ces organites (Jones and McLauchlan 2010). Les étapes d'assemblage et de maturation sont dépendantes des protéines de l'hôte, notamment ApoE, ApoB et MTP (microsomal triglyceride transfer protein)

(Gastaminza, Cheng et al. 2008). En outre, il a été démontré que la relâche dépend aussi de la protéine hôte DGAT1 (diacylglycerol acyltransferase-1) qui agit en concert avec Core et le relocalise aux LDs, un phénomène essentiel à la formation efficace des particules virales (Herker, Harris et al. 2010). L'assemblage et la relâche nécessitent la coopération de plusieurs protéines virales. En plus de la protéine Core, certaines protéines non structurales virales comme NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B ont été retrouvées accumulées à la proximité des LDs, sur le site proposé de l'assemblage viral (Popescu, Rouille et al. 2011).

Fait intéressant, la protéine virale p7 module le pH des vésicules intracellulaires, et une mutation dans le gène qui encode cette protéine altère la capacité du virus à produire des virions (Wozniak, Griffin et al. 2010, Popescu, Rouille et al. 2011, Dubuisson and Cosset 2014).

## **1.5 Le génome du virus de l'hépatite C**

Tel qu'expliqué précédemment, le génome du VHC est constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive. Il contient un seul ORF codant pour une polyprotéine d'environ 3000 acides aminés. L'ORF est flanqué aux deux extrémités par des régions non traduites désignées 3'UTR et 5'UTR (Figure 1.8) qui contiennent des éléments de réplication agissant en cis (CRE), lesquels sont essentiels au cycle viral (Friebe and Bartenschlager 2002, Kieft, Zhou et al. 2002, Yi and Lemon 2003). Ces éléments se lient à des protéines cellulaires telles que des protéines ribosomales humaines (Hahm, Kim et al. 1998, Wood, Frederickson et al. 2001, Pudi, Abhiman et al. 2003).



**Figure 1.8 : Les structures retrouvées dans le 3'UTR et le 5'UTR de l'ARN génomique du VHC (adaptée de (Lohmann 2013)).** (a) Extrémité 5 'du brin viral positif. Deux exemplaires de miR-122 se liant à la 5'UTR sont affichés (en orange). (b) Extrémité 3 'du brin viral positif. Les interactions à longue distance de la tige-boucle SL3.2 avec des séquences situées au niveau du nucléotide#9110 (Tuplin, Struthers et al. 2012) et avec la région contenant la tige-boucle SL2 (Friebe, Boudet et al. 2005) sont indiquées par des flèches.

### 1.5.1 Structure-fonction de la 5'UTR du VHC

La région 5' non codante (5'UTR), d'une longueur de 341 nt, est hautement conservée et comprend 3 à 5 codons AUG non initiateurs de la traduction. Cette région contient un élément IRES qui dirige la traduction coiffe-indépendante de la polyprotéine virale (Tsukiyama-Kohara, Iizuka et al. 1992, Wang, Sarnow et al. 1993), et contient aussi un signal d'ARN nécessaire à la réplication et qui se chevauche avec les signaux de la traduction (Friebe, Lohmann et al. 2001, Kim, Kim et al. 2002).

La 5'UTR du VHC est pliée au moins en 4 domaines riches en structures de type tiges-boucles (domaine I à IV) qui ont été largement étudiées pour les génotypes 1 et 2 (Brown, Zhang et al. 1992, Honda, Beard et al. 1999, Friebe and Bartenschlager 2009, Niepmann 2013) (Figure 1.8a). Les domaines I et II (nt 1 à 115) sont essentiels à la réplication du génome viral et contiennent deux sites de liaison pour la microARN-122 (miR-122) qui stimulent la traduction de l'ARN du VHC ainsi que la réplication (Jopling, Yi et al. 2005, Henke, Goergen et al. 2008), et améliorent la stabilité de l'ARN (Shimakami, Yamane et al. 2012, Sedano and Sarnow 2014).

Le site IRES est en chevauchement partiel avec ces signaux de réplication, et comprend les domaines II, III et IV (nt 116 à 341) ainsi que les premiers 20-40 nt de la région codante (Friebe, Lohmann et al. 2001). L'ARN ne possède pas de coiffe (en 5') ni de queue poly-A (en 3') (Brown, Zhang et al. 1992, Honda, Brown et al. 1996), autrement nécessaires à la traduction qui s'initie par la fixation de la sous-unité 40S du ribosome. Le domaine III est une région complexe formé de plusieurs tige-boucles comprenant les sous domaines IIIa, b, c, d, e et f (Brown, Zhang et al. 1992). Le domaine III d est particulièrement important pour le fonctionnement de l'IRES (Barria, Gonzalez et al. 2009), car il est impliqué dans l'interaction avec la sous-unité ribosomale 40S (Kolupaeva, Pestova et al. 2000, Lukavsky, Otto et al. 2000). Le domaine IV

comprend une petite structure tige-boucle qui contient le codon initiateur AUG situé dans la région simple brin de la boucle. La présence d'un ARN 'pseudonoeud' permet le positionnement du codon d'initiation AUG au niveau du site P du ribosome (Pestova, Shatsky et al. 1998, Otto and Puglisi 2004, Hellen 2009).

Comme l'IRES est essentielle à la réplication virale et sa séquence est bien conservée parmi tous les géotypes du VHC, sa structure représente une nouvelle cible pour la conception de médicaments (Davis and Seth 2011).

### **1.5.2 Structure-fonction de la 3'UTR(+) du VHC**

La 3'UTR est nécessaire pour la synthèse du brin négatif de l'ARN viral (Yanagi, St Claire et al. 1999, Friebe and Bartenschlager 2002, You and Rice 2008). Il s'agit d'un élément structurel évolutivement conservé et d'environ 200 nt de longueur, situé en aval du cadre de lecture ouvert (Kolykhalov, Feinstone et al. 1996). La 3'UTR est absolument essentielle à la réplication du VHC (Friebe and Bartenschlager 2002, Yi and Lemon 2003). Sa structure tripartite est composée de trois régions structurellement distinctes. Il y a d'abord une région variable (VR) non traduite, de 40 nt, comprenant deux boucles (VSL1 et VSL2), et située directement en aval de la région NS5B juste après le codon terminateur. La VR est mal conservée parmi les isolats du VHC ; cette région est dispensable à la réplication, malgré que sa délétion cause une baisse de l'efficacité de la réplication de l'ARN viral (Friebe and Bartenschlager 2002, Yi and Lemon 2003).

Ensuite, il y a une région polypyrimidine U/C, désignée poly (U/UC), mesurant normalement entre 30 et 80 nucléotides. La poly (U/UC) est très hétérogène par rapport à la longueur et à la

séquence; ainsi on voit des variations considérable de cette région entre les différents génotypes (Yamada, Tanihara et al. 1996). Cette région est composée de sections d'uridine homopolymériques entrecoupés par des cytosines. L'uridine ne peut pas être remplacé par d'autres nucléotides homopolymériques ; cependant, une longueur minimale de 26-33 uridines consécutifs est essentielle et suffisante pour la réplication efficace de l'ARN viral en culture cellulaire (Friebe and Bartenschlager 2002, You and Rice 2008).

Enfin, on retrouve une région terminale hautement conservée (3'X ou X-tail) de 98 nt, pouvant former deux conformations différentes. Une des conformations est composée de trois domaines de type tige-boucles désignés SLI, SLII et SLIII, numérotés de 3 'à 5' par rapport au brin négatif (Blight and Rice 1997). La réplication efficace de l'ARN viral nécessite la pleine longueur de 3'X (Friebe and Bartenschlager 2002). Il fut démontré que la SLII collabore avec la tige-boucle 5BSL3.2 (située dans la région NS5B), étant un élément de réplication agissant en cis (CRE), pour initier la synthèse d'ARN à brin négatif (You, Stump et al. 2004). La SLIII, quant à elle, a une longueur de 46 nucléotides et est la plus stable des trois tige-boucles.

La conformation alternative de X-tail est formée de seulement deux tige-boucles. La SLI reste la même, mais les SLII et SLIII se voient fusionnées en une tige-boucle unique qui comprend la séquence dite 'dimerization linkage sequence' (DLS) située dans la boucle apicale, laquelle serait nécessaire pour la dimérisation de l'ARN génomique, et éventuellement pour l'encapsidation du génome (Ivanyi-Nagy, Kanevsky et al. 2006, Shetty, Kim et al. 2010, Cantero-Camacho and Gallego 2015).



### 1.5.3 La région codante de NS5B

La région NS5B, qui code pour la RdRp, est considérée la force motrice de la synthèse de l'ARN viral et, à ce titre, représente une excellente cible pour le développement d'inhibiteurs sélectifs du VHC (Powdrill, Bernatchez, and Gotte2010 ; Tomei et al. 2004). Cette région est phylo génétiquement conservée, et contient cinq structures de type tige-boucle (Tuplin, Wood et al. 2002, Diviney, Tuplin et al. 2008), notamment : 5BSL1 (également appelée SL9033), 5BSL2 (SL9132), 5BSL3.1 (SL9217), 5BSL3.2 (SL9266) et 5BSL3.3 (SL9324). Les numéros des nucléotides sont basés sur le VHC 1a de la souche H77 (GenBank # AF011753).

Tel que mentionné ci-haut, la 5BSL3.2 est un élément essentiel à la réplication du VHC agissant en cis (CRE) (Lee, Shin et al. 2004, You, Stump et al. 2004, Friebe, Boudet et al. 2005, Diviney, Tuplin et al. 2008). La 5BSL3.2 est impliquée dans plusieurs interactions à distance. Sa boucle apicale forme une structure tertiaire appelée « kissing-loop » avec la SL2 du X-tail (Friebe, Boudet et al. 2005), ce qui module les processus de réplication et de traduction de l'ARN viral (You, Stump et al. 2004, You and Rice 2008, Shetty, Stefanovic et al. 2013). En outre, la 5BSL3.2 peut interagir soit avec la boucle apicale SLIId de l'IRES (Romero-Lopez and Berzal-Herranz 2009), ou encore avec une séquence appelée CRE 9110 dans la région codante de NS5B, qui est située entre 5BSL1 (SL9033) et 5BSL2 (SL9132) pour produire une structure 'pseudonoeud' (Diviney, Tuplin et al. 2008).

Par rapport aux interactions protéiques, l'activité RdRp de la région NS5B serait affectée par d'autres protéines du VHC. Notamment, il fut démontré que l'interaction entre NS5A et NS5B est essentielle pour la réplication de l'ARN du VHC dans le système réplicon (Shimakami, Hijikata et al. 2004). Fait intéressant, la NS5A semble pouvoir moduler l'activité RdRp NS5B

(Shirota, Luo et al. 2002). En outre, il fut rapporté que la protéine Core se lie à la RdRp pour ainsi inhiber l'activité de synthèse de l'ARN du VHC 1b in vitro (Kang, Choi et al. 2009).

## 2. JUSTIFICATION, HYPOTHÈSE ET BUT DU PROJET DE RECHERCHE

Les interactions ARN-ARN distales ont un rôle important dans le cycle viral (Alvarez, Lodeiro et al. 2005, Villordo and Gamarnik 2009). Il est connu que la région désignée 3'UTR a un rôle dans la réplication du VHC. Cependant, la fonction de la 3'UTR lorsqu'impliquée dans des interactions génomiques ARN-ARN reste encore à élucider.

Tel qu'indiqué dans l'Introduction, la 3'UTR du génome VHC a une structure tripartite composée d'une région variable (VR), une séquence répétée poly (U/UC) et une région hautement conserve (X-tail). Des études antérieures ont démontré que les régions X-tail et poly (U/UC) constituent des éléments minimaux nécessaires pour la synthèse de l'ARN viral (Yi and Lemon 2003). La région VR semble plutôt faciliter la synthèse de l'ARN viral (Friebe and Bartenschlager 2002, Yi and Lemon 2003).

Les motifs structuraux de la région X-tail ont fait l'objet des premières recherches sur la synthèse de l'ARN viral. Cependant, les contributions potentielles des structures tertiaires situées à l'intérieur de l'ORF furent largement ignorées. Depuis, il y a eu plusieurs rapports visant les éléments génomiques situés dans la région adjacente à la X-tail, notamment la NS5B. Cette dernière contient cinq structures tige-boucles conservées phylogénétiquement (Tuplin, Evans et al. 2004), désignées SL9033, SL9132, SL9217, SL9266 et SL9324. Des travaux récents ont démontré que la SL9266, avec les structures adjacentes SL9217 et SL9324, coordonnent et renforcent la réplication du VHC par des appariements de bases avec la SL2 située dans la région X-tail (Diviney, Tuplin et al. 2008, Tuplin, Struthers et al. 2012).

À l'aide de la génétique inverse et de méthodes bio-informatiques, des chercheurs ont révélé l'existence d'une interaction à distance entre un petit renflement de la tige-boucle SL9266 et une séquence non structurée située proche du nt 9110 dans la région NS5B (Diviney, Tuplin et al. 2008, Tuplin, Struthers et al. 2012) qui a un effet positif sur la réplication de l'ARN du VHC. On ignore le mécanisme par lequel cet appariement contribue à la réplication du virus.

D'autre part, notre laboratoire a mis en évidence la présence d'ARN double-brin entre le fragment VR-poly (U/UC) et une séquence inconnue située à la droite du SL9033 de la région NS5B (Rance et al. 2013). Alors, considérant que la région NS5B code pour la polymérase virale et, sur la base de nos résultats récents de laboratoire, nous émettons comme hypothèse que la dite séquence dans NS5B œuvre conjointement avec une séquence homologue située dans la 3'UTR-VR (la région VR étant variable entre génotypes mais conservée à l'intérieur d'un même génotype), pour ainsi contrôler le niveau de synthèse de l'ARN du VHC. Ceci pourrait expliquer les différences dans la capacité répliquative entre les génotypes du VHC. Alors, nous visons à déterminer si cet appariement impacte la réplication du VHC. Ainsi, le but de mon projet de maîtrise est d'étudier l'effet de l'appariement entre les séquences ciblées sur la réplication de l'ARN viral.

## 3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 3.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain Huh7.5 a été cultivée dans le milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS), les antibiotiques pénicilline/streptomycine et des acides aminés non essentiels, sous 5% CO<sub>2</sub> à 37°C.

### 3.2 Construction des mutants du VHC

Le plasmide d'expression de l'ARN du VHC génotype 1b (pER1b) a été construit à partir du plasmide pGEM-7Zf-HCV1b avec l'ajout des séquences complémentaires du 5'UTR microARN-122 et du 3'UTR de génotype 1b (Takamizawa, Mori et al. 1991, Jopling, Yi et al. 2005). En outre, nous avons effectué une altération du promoteur RNA polymérase pGEM T7 GAATACAAGCTTGTAATACGACTCACTATAGCCAGCCCC afin de restreindre la transcription ARN à la guanine terminale (souligné) du génome VHC authentique (Rance et al. 2013).

#### Construction des cassettes VHC et 3'UTR

Les mutants (mut) du VHC 3'UTR ont été produits suite à la construction d'un plasmide comportant le génome VHC sans le 3'UTR et l'ajout d'un site de restriction unique *XbaI* placé à la fin de l'ORF NS5B. Le site de restriction unique *XbaI* a été généré par PCR à l'aide des amorces 2 et 10 (voir Tableau 3.1) et de l'enzyme *Taq pfx* à fidélité haute. Malgré que l'introduction du site unique *XbaI* dans les séquences 8547-9382 du NS5B ait introduit l'asparagine à la place de la sérine terminale (acide aminé 3009), on s'attendait à ce que cette

altération n'ait aucune conséquence sur l'activité de l'ARN polymérase ni sur le positionnement transmembranaire du NS5B dans le complexe de répllication virale (Takamizawa, Mori et al. 1991). Suite à la digestion du fragment d'ADN amplifié et du pER1b par les enzymes de restriction *XbaI* et *KpnI* (Figure 3.1, HCV1b strain ER1b), il y a eu échange des fragments d'ADN afin d'introduire le gène NS5B (modifié par le *XbaI*) dans pER1b. Ce plasmide a été désigné « HCV1b ER1b cassette » (Figure 3.1, HCV1b strain ER1b cassette (CS)). Les constructions HCV1b CS-HCV1b 3'UTR, HCV1b CS-HCV2a UTR et HCV 1b CS-3'UTR VR<sub>mut</sub> (VR) ayant un HCV1b 3'UTR<sub>wt</sub>, un HCV2a 3'UTR<sub>wt</sub> et un HCV1b 3'UTR avec mutation dans la séquence VR, respectivement, ont été produites par mutagenèse dirigée à l'aide d'amorces et PCR. Les gabarits ADNc des HCV1b and HCV2a retrouvés dans pER1b and pJFH-1 (Kato, Furusaka et al. 2001) ont été amplifiés moyennant l'enzyme *pfx* et l'ER1b-*XbaI*-3'UTR sens (primer 3), ER1b-*XbaI*-JFH-3'UTR sens (primer 5), ER1b-*XbaI*-ER1b-VR<sub>mut</sub> sens (primer 8) et *XbaI/XhoI*-3'UTR-antisens (primer 4) (Tableau 3.1). Suite au clonage intérimaire dans pTOPO-blunt (ThermoFisher, Montreal, Quebec), les fragments d'ADN contenant les 3'UTRs respectifs ont été coupés avec l'enzyme *XbaI* and ligaturés dans le site unique *XbaI* du plasmide HCV1b ER1b CS.

#### Mutant d'homologie NS5B-VR

Le mutant NS5B a été conçu afin de brimer l'appariement avec les séquences complémentaires du 3'UTR VR et de permettre l'hybridation avec celles du mutant VR. Les changements effectués n'ont pas affecté la séquence codante de la polymérase NS5B<sub>wt</sub> du VHC 1b.

Le fragment ADNc du VHC 1b *EcoR1/XbaI* (position nucléotidique 6700-9609) qui contient la moitié terminale du gène NS5A, ainsi que le gène entier NS5B et le 3'UTR, a été cloné dans le pUC19 afin de servir de gabarit lors de la construction du mutant NS5B-VR. Le mutant NS5B-VR a été construit à partir de l'ADN de NS5B<sub>mut</sub> sens (primer 6) et HCV1b-NS5B PSR-*Xba* anti-sens (primer 2) ainsi qu'avec NS5B<sub>mut</sub> anti-sens bridge (primer 7) et, en amont, le *Bgl2* NS5B sens (primer 9), chacun amplifié par *pfx*. Ces deux fragments d'ADN ont été ligués afin de générer le gène NS5B avec le VR muté selon notre conception. Suite aux digestions avec *KpnI* et *XbaI*, l'ADN du mutant NS5B-VR a été introduit en place de l'ADN correspondant retrouvé dans le plasmide de la cassette HCV1b ER1b. Le plasmide de la cassette HCV1b ER1b qui contient l'ADN du mutant NS5B-VR a été utilisé avec les fragments *XbaI* encodant le HCV1b 3'UTR ou le HCV 3'UTR contenant le VR<sub>mut</sub> (VR) afin de générer le HCV NS5B<sub>mut</sub> et le NS5B-VR<sub>double mut</sub>.

**Tableau 3.1 : Amorces utilisées pour la construction des mutants VHC.**

Constructions HCV	Initiateur #	Nom de l'initiateur	Position génomique VHC *	Séquences
Cassette (CS)	1	HCV1b-NS5B PSR-Xba sens	9351-9382	ATC TAC CTG CTC CCC TCT AGA TGA ACG GGG AG
	2	HCV1b-NS5B PSR-Xba anti-sens	9351-9382	CTC CCC GTT CAT CTA GAG GGG AGC AGG TAG AT
HCV1b CS-3'UTR	3	ER1b-XbaI-3'UTR sens	9358-9384	TGCTCCCCtctagaTGAACGGGG AGCT
	4	XbaI/XhoI-3'UTR-antisens	9595-9609	tctaga/ctcgag ACATGATCTGCAGAG
HCV2a CS-3'UTR	5	ER1b-XbaI-JFH-3'UTR sens	9440-9457	ccctctagaTAGAGCGGCACACAC TAG
NS5B mut (NS)	6	NS5B mut sens	9102-9143	CAT CGT GCT CGT TCT GTA CGC GCT AGG CTA CTG TCC CAG GGA
	7	NS5B mut antisens bridge	9081-9101	TCT CCA GAC TCG CAA GGG TGG
	7a	ER1b AS NS5B-stop	9350-9374	TCA TCG GTT GGG GAG CAG GTA GAT G
	7c	Xba HCV tail		ggggtctagaACATGATCTGCAGA
CS-3'UTR VR mut (VR)	8	ER1b-Xba-ER1b-VR mut sens	9372-9409	ccctctagaTGAACGGGGAGCTAT ACAGAACGAGCAAATAGGCC ATC
Initiateur accessoire	9	Upstream Bgl2 NS5B sens	8857-8876	GGG CAA GGA TGA TTC TGA TG
Initiateur accessoire	10	Fp linker primer sens	8547-8572	GGAAACGACCTCGTCGTTATC TGTGA

\* Numérotation nucléotidique basée sur les souches de référence VHC1b H77 AF009606 et VHC2a JFH-1 AB047639.



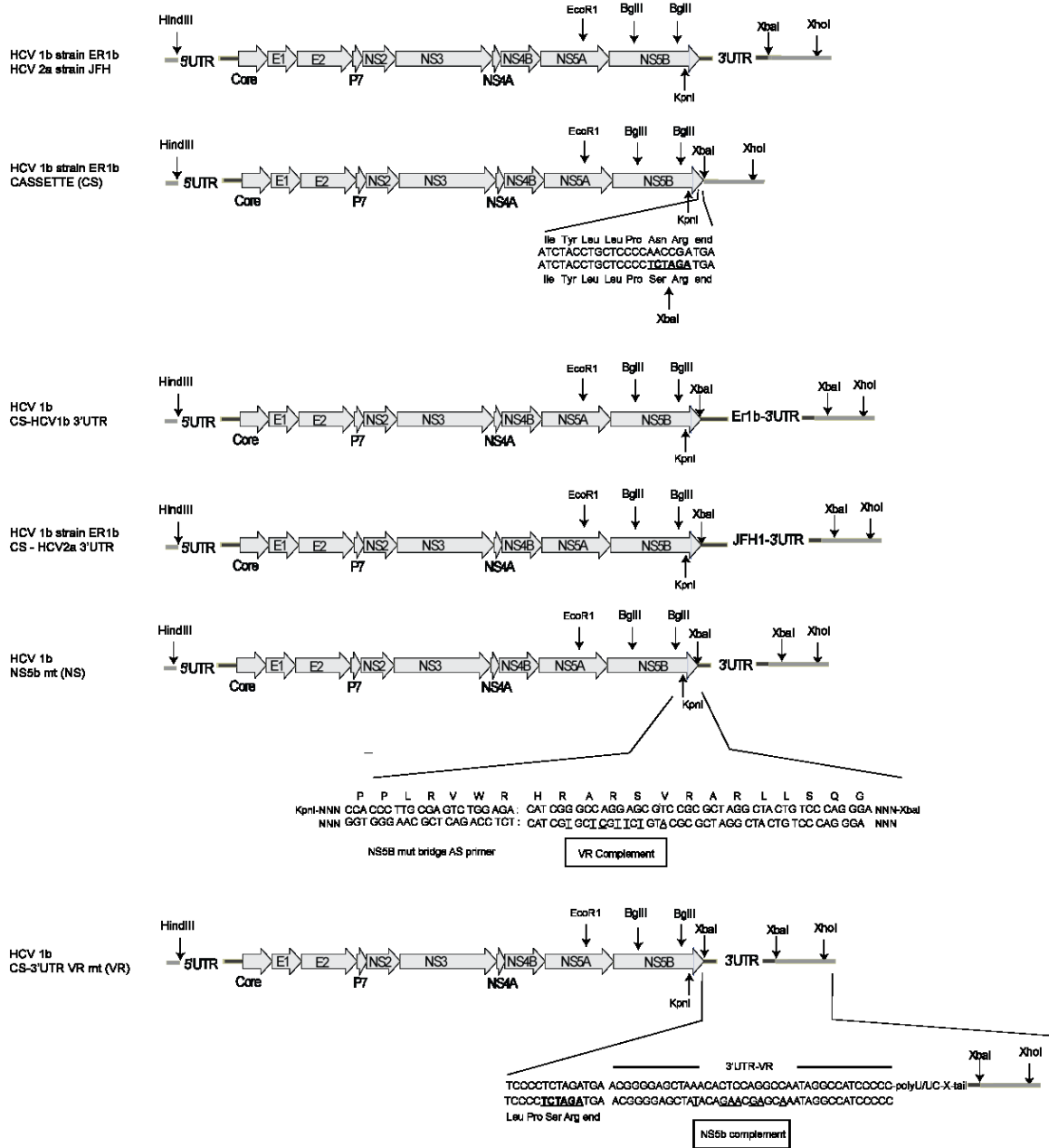


Figure 3.1 : Schéma des constructions VHC telles que décrites dans le texte.

### 3.3 Transformation et préparation d'ADN plasmidique

Les cellules compétentes *E.coli* DH5 $\alpha$  gardées à -80°C ont été décongelées lentement sur la glace. Dans un tube eppendorf, 100  $\mu$ l de cellules compétentes et 8  $\mu$ l de produit de ligation ont été mélangés et mis sur glace pendant 45 minutes. Les tubes ont été transférés dans un bain à 42°C pour 90 secondes pour ensuite être remis sur glace pour 2 minutes. Ensuite, 1 ml de milieu SOC a été ajouté, et le tout mélangé par inversion du tube. Le milieu SOC, étant riche, est utilisé principalement pour maximiser l'efficacité de transformation des cellules *E. coli*. Ensuite, une incubation de 2 heures avec agitation à 200 rpm a été effectuée, et 100  $\mu$ l de ce mélange a été étalé sur un pétri LB contenant de l'ampicilline (50  $\mu$ g/ml). Le pétri a été incubé à 37°C pendant 16 heures. Le lendemain, une colonie a été piquée et inoculée dans un tube contenant 4 ml de bouillon LB avec ampicilline (50  $\mu$ g/ml). La culture bactérienne a été incubée à 37°C pour la nuit avec agitation à 200 rpm. Ensuite, l'ADN bactérien a été extrait à l'aide de la trousse Midiprep de Qiagen. La concentration de l'ADN plasmidique purifié a été déterminée par spectrométrie, et la taille du plasmide a été vérifiée suite à sa migration sur gel d'agarose 0.8%.

### 3.4 Expression des ARN génomiques du VHC

Les plasmides ER1b (génotype 1b) construits des génomes VHC wt et muté, et le plasmide JFH1 (génotype 2a) de génome wt, ont été linéarisés en premier par l'enzyme de restriction *Xba*I ou *Xho*I (selon le Tableau 3.2) pendant 2 heures à 37°C, et ensuite par la nucléase *mung* bean (0.5 U) (New England Biolabs) pour 30 minutes à température ambiante pour former des extrémités franches. Le produit de chacune des digestions a été vérifié sur gel d'agarose 0.8%.

Les ARN génomiques (HCV<sub>wt</sub>, HCV<sub>mut</sub>) ont été synthétisés à l'aide de la trousse T7 MEGAscript (High Yield Transcription Kit, Ambion Inc) et 1  $\mu$ g d'ADN plasmidique. Les

réactions de transcription ont été incubées pendant 5 heures à 37°C, suivi par la dégradation de la matrice d'ADN avec la TURBO DNase pendant 15 minutes à 37°C. L'ARN a été purifié avec le chlorure de lithium et précipité dans l'éthanol 75%. La taille des ARN génomiques a été vérifiée par migration sur gel de formaldéhyde-agarose.

**Tableau 3.2 : Liste des plasmides d'ADN utilisés pour les réactions de transcription, avec leur description et l'enzyme de restriction servant à la linéarisation**

Échantillons	Description	Enzyme de restriction
pER1b (wt)	Plasmide ER1b (1b) sans mutations	XbaI
pER1b (VR)	Plasmide ER1b avec mutation dans la région variable du 3'UTR	XhoI
pER1b (NS)	Plasmide ER1b avec mutation dans la région NS5B	XbaI
pER-1b (Dbl)	Plasmide ER1b avec mutations complémentaires dans la région variable du 3'UTR et dans le NS5B	XhoI
pER1b (CS)	Plasmide ER1b cassette sans 3'UTR + le site de restriction XbaI	XbaI
pER1b (CW)	Plasmide ER1b cassette + 3'UTR de ER-1b.	XhoI
pJFH1 (wt)	Plasmide JFH1 (génotype 2a) sans mutations	XbaI
Huh7.5 (-)	Cellules Huh7.5 sans ARN viral	

### **3.5 Transfection par électroporation**

La transfection des cultures confluentes de Huh7.5 par les ARN génomiques a été réalisée par électroporation. Les cellules Huh7.5 ont été rincées avec du DPBS (Dulbecco's PBS) et trypsinisées. Ensuite, du DMEM supplémenté a été ajouté afin d'arrêter l'activité de la trypsine. Suite au lavage et centrifugation, les cellules ont été remises en suspension à une concentration de  $1 \times 10^7$  cellules/transfection dans 500  $\mu$ l de milieu de transfection cytomix. Dix microgrammes d'ARN génomique a été ajouté à la suspension cellulaire dans un tube de 1,5 ml et placé sur glace pendant 10 minutes. Le mélange a ensuite été transféré dans une cuvette d'électroporation et pulsé deux fois à 260 V/950  $\mu$ F.

Le milieu cytomix a été préparé tel que décrit auparavant (van den Hoff, Moorman et al. 1992), selon la formulation suivante : 120 mM KCl, 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.6, 25 mM HEPES pH 7.6, 2 mM EDTA pH 7.6, 5mM MgCl<sub>2</sub>, et supplémenté au moment de l'utilisation avec ATP 2mM/glutathione 5mM (ATP/GLU). Le pH final du milieu a été ajusté à 7.6 avec du KOH 1N. Un volume total de 200 ml a été préparé et stérilisé par filtration.

### **3.6 Viabilité cellulaire et efficacité de la transfection**

Divers milieux de transfection ont été essayés afin de pouvoir sélectionner le plus efficace. Ces milieux incluent : PBS, DMEM, cytomix, et DMEM + ATP/GLU.

Suite à la transfection, la cuvette a été mise sur glace pendant 5 minutes, et les cellules transfectées ont été transférées dans deux plaques de six puits contenant chacune 4 ml de milieu de culture DMEM supplémenté. Les cellules ont été incubées à 37°C dans 5% CO<sub>2</sub> pour une période de 24 heures afin de permettre aux cellules viables de se fixer sur la plaque de culture.

Après 24 heures, le milieu a été aspiré et remplacé par 4 ml de DMEM frais. Les cellules ont été incubées de nouveau à 37°C pendant 24 heures. Ensuite, les cellules non viables en suspension ont été aspirées et les cellules adhérentes ont été lavées avec du DPBS, trypsinisées, et centrifugées dans 100 µl de DPBS.

La viabilité cellulaire a été déterminée par la technique d'exclusion du bleu de trypan à l'aide d'un hématimètre et visualisation microscopique à 400X. Le pourcentage des cellules claires (viables) versus les cellules bleues (mortes) a été calculé.

Afin de vérifier l'efficacité de la transfection, nous avons transfecté le pHook-GFP dans des cellules Huh7.5 sous les mêmes conditions que décrites ci-dessus, et avons compté le nombre de cellules exprimant la protéine verte fluorescente sur un total de 200 cellules.

### **3.7 Cinétique de production du VHC**

La transfection de l'ER1b et JFH1 dans les cellules Huh7.5 a été réalisée dans le milieu cytomix préparé selon la formulation indiquée ci-dessus. Suite à la transfection, les cellules ont été transférées dans deux flacons T75 contenant chacun 10 ml de milieu de culture DMEM supplémenté.

Vingt-quatre heures post transfection, les cellules ont été lavées avec du DPBS, trypsinisées et centrifugées à 1200 rpm pendant 10 minutes, tel que décrit dans la section précédente. Ensuite, 5 ml de DMEM a été ajouté au culot cellulaire de chaque transfection. Le 5 ml de chaque mélange cellulaire a été distribué dans cinq flacons T25, à raison de 1 ml par flacon. Ensuite, 5 ml de DMEM a été ajouté à chaque flacon et les cultures ont été incubées à 37°C dans 5% CO<sub>2</sub>. Des extractions séquentielles de l'ARN du surnageant des cultures ont été effectuées à partir du

jour 0 et jusqu'au jour 9 post-incubation. La technique RT-qPCR a été effectuée à l'aide de la trousse « QuantiTect SYBR Green RT-qPCR » (Qiagen) pour quantifier les particules virales ER1b et JFH1 relâchées dans le surnageant des cultures.

### **3.8 Extraction de l'ARN du surnageant**

L'ARN viral a été extrait à partir de 250 µl de surnageant des cultures transfectées. Pour éliminer le débris cellulaire, une centrifugation à 13 000 rpm durant 10 minutes a été effectuée et le surnageant a été transféré dans un autre tube eppendorf. Ensuite, 10 µl de glycogène et 500 µl de TriReagent (Molecular Research Center, Inc.) ont été ajoutés au tube contenant le surnageant, suivi par une incubation de 5 minutes à la température ambiante pour permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Une fois la dissociation complétée, 100 µl de chloroforme a été ajouté et le contenu de tube a été mélangé en brassant vigoureusement. Le tube a été incubé à la température ambiante pour 5 minutes et centrifugé à 12 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Ensuite, la phase aqueuse qui se retrouve sur le dessus a été transférée dans un nouveau tube eppendorf pour la précipitation de l'ARN.

Afin de précipiter l'ARN, 250 µl d'isopropanol ont été ajoutés et le contenu du tube a été mélangé par inversion. Le tube a été incubé à température ambiante pendant 10 minutes suivi par une centrifugation à 12 000 x g de 10 minutes à 4°C. Le culot a été lavé avec 500 µl d'éthanol à 75% et centrifugé à 12 000 x g pendant 5 minutes. Le surnageant a été soigneusement aspiré et le culot séché à l'air pendant 5-10 minutes. Ensuite, 15 µl d'H<sub>2</sub>O stérile déionisée a été ajouté et le tube incubé à 58°C durant 10 minutes. Ces extractions d'ARN ont été congelées à -80°C jusqu'à l'utilisation ultérieure.

### 3.9 Extraction de l'ARN des cellules transfectées

Pour permettre l'extraction des ARN viraux des cellules Huh7.5 transfectées, les cellules ont été lavées avec du DPBS. Ensuite, 1 ml de TriReagent a été ajouté aux flacons afin de décoller les cellules et permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques, suivi par une incubation de 5 minutes à température ambiante. Ensuite, les mêmes étapes décrites ci-dessus pour l'extraction de l'ARN du surnageant des cultures transfectées ont été suivies.

### 3.10 Quantification de l'ARN génomique du VHC

La quantification de l'ARN et la production virale ont été réalisées par RT-qPCR à l'aide de la trousse « QuantiTect SYBR Green RT-qPCR » pour avoir le nombre de copies d'ARN génomique du VHC. Les séquences des amorces utilisées sont : 5'-AGAGCCATAGTGGTCTGCGG-3' (sens) et 5'-CTTTCGCGACCCAACACTAC-3' (antisens). Le GAPDH est un gène cellulaire exprimé de façon constitutive. L'ARN du GAPDH a été amplifié en parallèle afin de normaliser l'ARN viral et de servir de contrôle positif à cette réaction (Tableau 3.3).

**Tableau 3.3: Séquences des amorces/sonde GAPDH.**

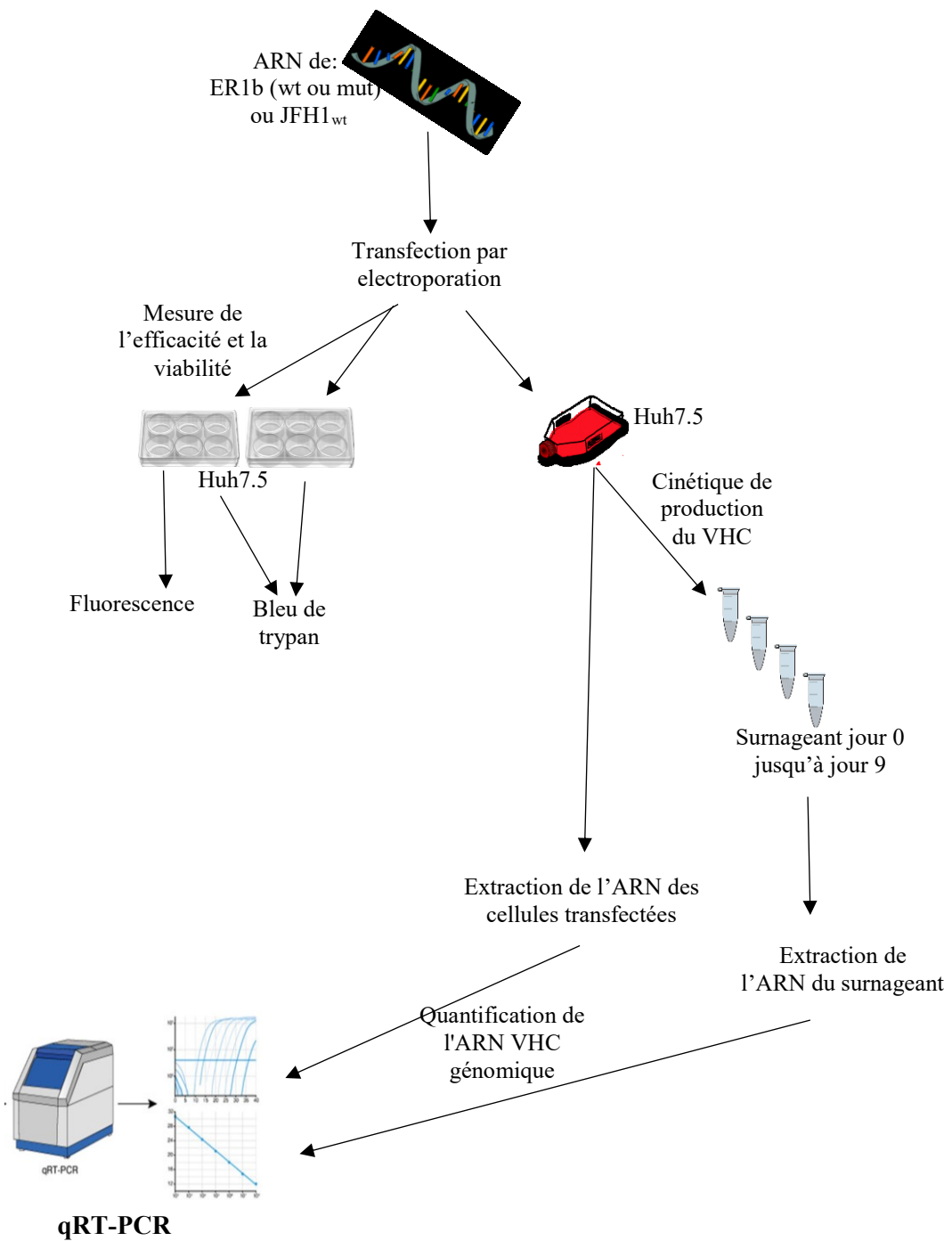
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseADNc M33197.1*	
T7 pol:GAPDH sens	gtaatac gactcactataggagaCGAGCCACATCGCTCAGACAC
GAPDH antisens	CTTCCTCTTGTGCTCTTGCTG
Sonde**	
Sens	GTG AAG GTC GGA GTC AAC
Antisens	TGG AAT TTG CCA TGG GTG

\*Longueur du fragment = 1073 pb. \*\*Longueur du fragment = 161 pb.

L'ADNc du VHC a été amplifié et quantifié à l'aide de l'appareil Mx3000P real-time PCR thermocycler (Stratagene Inc.) pendant 45 cycles. Chaque cycle est constitué d'une étape de dénaturation de 15 secondes à 94°C, suivie par l'étape d'hybridation à 59°C pour les amorces VHC et à 55°C pour les amorces GAPDH pendant 30 secondes, et une étape d'élongation à 72°C pendant 30 secondes.

La quantité d'ARN du VHC a été normalisée selon la quantité d'ARN cellulaire totale. Des dilutions de l'ARN synthétique du VHC ER1b allant de  $10^8$  à  $10^2$  copies ont servi de référence pour la standardisation. Un organigramme incorporant les principales étapes méthodologiques est fourni ci-dessous (Figure 3.2).





**Figure 3.2 : Organigramme des étapes méthodologiques.**

## 4. RÉSULTATS

### 4.1 Observation de séquences complémentaires permettant l'appariement entre le VHC 3'UTR VR et le NS5B

Au préalable, notre laboratoire a observé une structure tertiaire duplexe dans l'ARN VHC, composée de séquences conservées à l'intérieur des génotypes. Ces séquences impliquent le 3'UTR VR (position 9387-9398) et une région distale située dans le NS5B (position 9107-9119) (Tableau 4.1). À partir de cette observation, et du fait que le VR soit immédiatement adjacent aux séquences poly (U/UC) qui sont impliquées dans la réplication du génome viral, nous avons entamé une série d'expériences à savoir si les séquences impliquées dans l'appariement entre le 3'UTR VR et le NS5B peuvent modifier le taux de synthèse de l'ARN viral.

**Tableau 4.1 : Comparaison de la structure duplexe VHC 3'UTR VR:NS5B chez le VHC de génotypes 1 et 2a**

Génotype (G) (souche)	3'UTR VR 9387-9398	% d'identité (Gx/G1b)	NS5B 9107-9119	% d'identité (Gx/G1b)
VHC 1b (Con1b/ER1b)	ACACUCCAGGCC	100 (12/12)	GGCCAGGAGCGU	100 (12/12)
VHC 1a (H77)	ACACUCC_GGCCU	92 (11/12)	GGCCC <sub>U</sub> GGAGCGU	92 (11/12)
VHC 2a (JFH1)	ACACACUAGGUA	66 (8/12)	AUCCAGUUGGUU	50 (6/12)

L'ombrage désigne les nucléotides non conservés de la souche en question versus le VHC 1b.

## 4.2 Cytomix permet une meilleure viabilité cellulaire et efficacité de transfection

Il fallait déterminer à priori le meilleur milieu pour l'électroporation des cellules Huh7.5. L'utilisation du cytomix avait été décrite auparavant (van den Hoff, Moorman et al. 1992). Nous avons vérifié la performance du cytomix dans un essai dont le but était de le comparer avec le PBS, le DMEM et le DMEM + ATP/GLU. L'utilisation du plasmide pHook-GFP nous a permis de vérifier l'efficacité de la transfection. Nos résultats démontrent que le cytomix et le DMEM + ATP/GLU favorisent davantage la viabilité cellulaire comparativement au PBS et au DMEM (Tableau 4.2). L'efficacité de la transfection était supérieure lors de l'utilisation du cytomix (Tableau 4.2). Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que le cytomix constitue le meilleur milieu pour la transfection des cellules Huh7.5, ce qui concorde avec l'étude antérieure (van den Hoff, Moorman et al. 1992).

**Tableau 4.2: Effet de divers milieux de transfection sur la viabilité cellulaire et l'efficacité de transfection**

Milieu	% viabilité Huh7.5*	% efficacité de la transfection*
PBS	8.0	
PBS + GFP	24.0	2.9
DMEM	41.0	
DMEM + GFP	11.3	3.0
Cytomix	44.1	
Cytomix + GFP	32.9	10.0
DMEM + ATP/GLU	43.7	
DMEM +ATP/GLU + GFP	26.1	5.8

\*Les chiffres sont la moyenne de trois expériences.

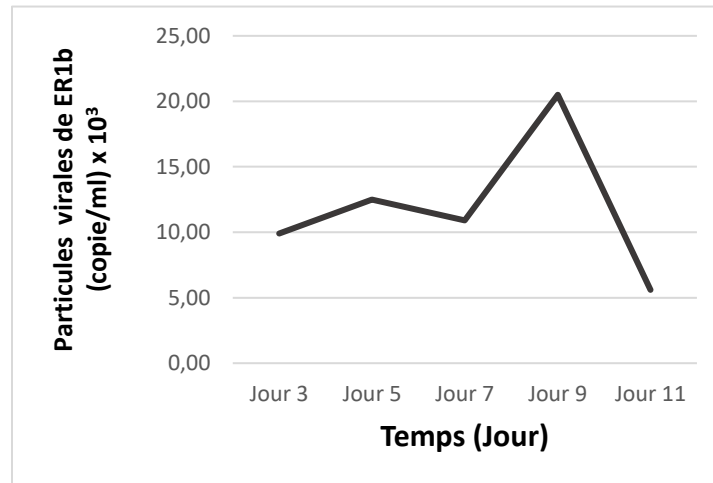
### **4.3 Détermination de la fenêtre temporelle de production du VHC suite à la transfection des cellules Huh7.5**

À l'aide de courbes de croissance, nous avons déterminé premièrement le cycle temporel de production virale dans le surnageant des cultures Huh7.5 transfectées par ER1b (génotype 1b) et JFH1 (génotype 2a). Le JFH1 (Wakita, Pietschmann et al. 2005) a été inclus pour qu'on ait un indice de comparaison connu. Le niveau d'ARN viral dans les milieux de culture a été quantifié par RT-qPCR à chaque 48 heures, et ce à partir du 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> jour post-transfection. La Figure 4.1 est représentative des courbes de croissance obtenues pour chacun des deux virus. Selon cette courbe, la quantité d'ARN de l'ER1b récupérée au 3<sup>e</sup> jour post-transfection était l'équivalent de  $9,91 \times 10^3$  copies/ml (Figure 4.1A). Pour le JFH1, la courbe montre une quantité de  $2,13 \times 10^5$  copies/ml au 2<sup>e</sup> jour post-transfection (Figure 4.1B).

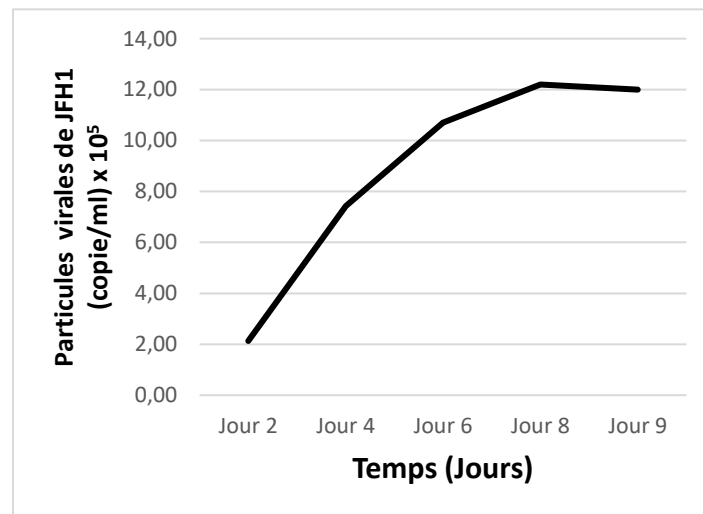
Les courbes de croissance ont démontré une augmentation constante d'ARN viral dans le surnageant de cultures transfectées par ER1b, avec l'atteinte d'un pic de  $2,05 \times 10^5$  au 9<sup>e</sup> jour post-transfection (Figure 4.1A). Pour JFH1 la quantité d'ARN viral a augmenté jusqu'au plateau atteint au 8<sup>e</sup> jour avec  $1,2 \times 10^6$  copies/ml (Figure 4.1B).

Ces données indiquent que la réplication du VHC ainsi que la libération de particules virales des cellules Huh7.5 transfectées surviennent pendant au moins 9 jours. Ceci nous a permis de déterminer la fenêtre de production virale afin de pouvoir gauger le temps d'observation pour l'échantillonnage séquentielle lors de la croissance les mutants.

A)



B)

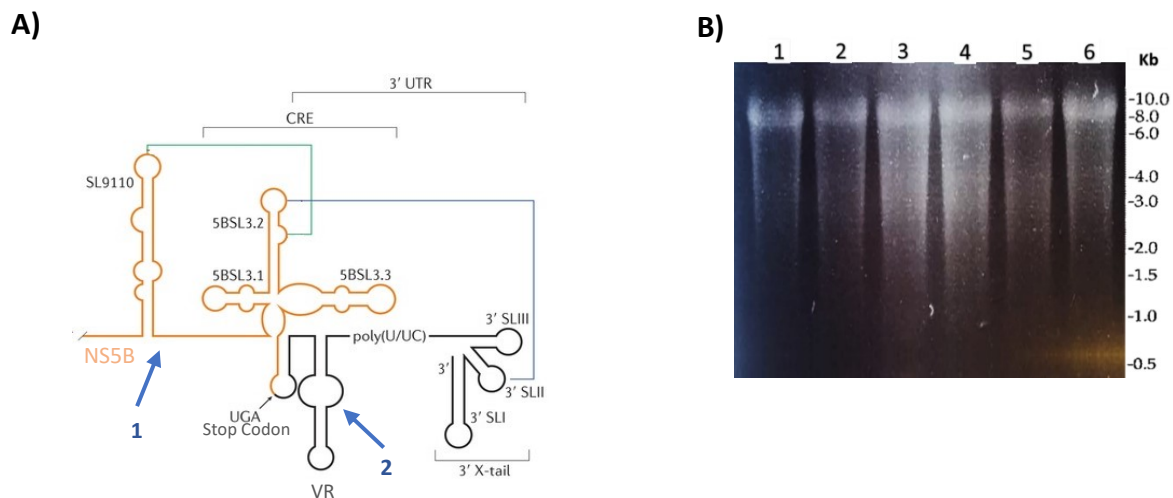


**Figure 4.1 : Cinétique de production du VHC.** A) Sécrétion du VHC ER1b notée pendant 11 jours post-transfection dans les cellules Huh7.5. B) Sécrétion du VHC JFH1 pendant 9 jours post-transfection dans les cellules Huh7.5. L'ARN viral a été extrait du surnageant des cultures séquentiellement à chaque 48 heures et quantifié par RT-qPCR. Les amorces GAPDH ont été employées pour normaliser l'ARN. L'expérience a été répétée trois fois. Malgré la grande variabilité dans la production virale, les données des trois expériences ont montré la même tendance. Les résultats d'une des expériences sont illustrés ici.

#### 4.4 Comparaison des niveaux d'ARN viral des mutants vis-à-vis le virus original

Les courbes de croissance nous ont indiqué que le pic de production virale survient autour du jour 9 post-transfection. Ainsi nous avons retenu cette fenêtre temporelle durant laquelle il serait possible de comparer l'effet de l'appariement entre la VR du 3'UTR (9378-9398) et la région NS5b (9107-9119) sur la réplication du VHC.

Des mutations dans ces deux régions ont été produites et les ARNs ont été synthétisés *in vitro* à l'aide de l'ARN pol T7, tel qu'expliqué dans le chapitre **Matériel et méthodes**. L'une (9119-UGCGAGGACCGG-9108) est dans la région NS5B, et l'autre (9387-ACACUCCAGGCC-9398) est dans la 3'UTR-VR. Les lettres en gras représentent les séquences mutées, sans toutefois causer d'altérations des acides aminés qui en dérivent. De plus, un ARN avec une double mutation complémentaire dans ces deux régions a été généré. La Figure 4.2 montre l'endroit des mutations (Figure 4.2A) et les ARNs migrés sur un gel de formaldéhyde-agarose (Figure 4.2B).



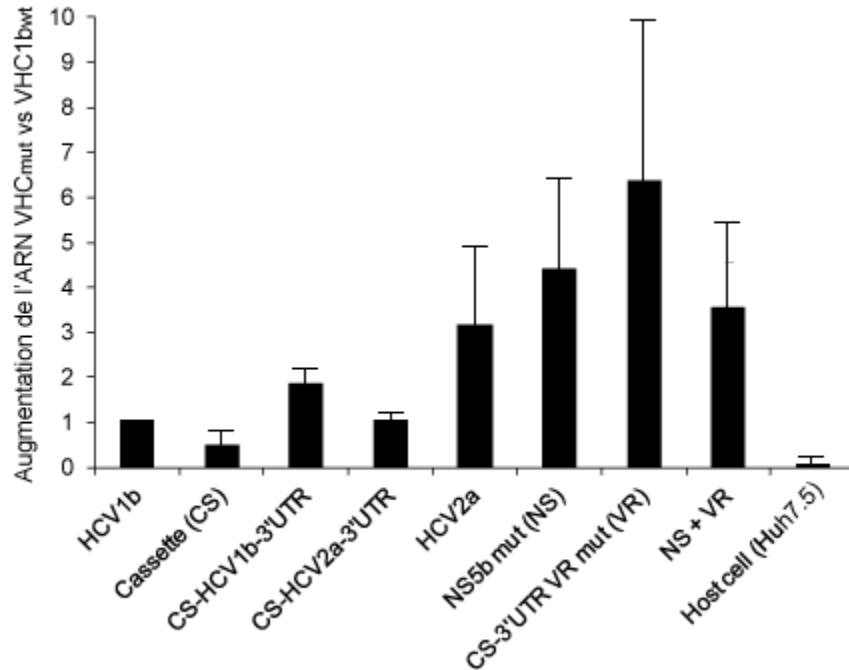
**Figure 4.2 : Les endroits mutés des régions 3'UTR-VR et NS5B du génome VHC et synthèse des ARNs génomiques.** A) Une représentation schématique (adaptée de (Li, Yamane et al. 2015)) démontrant la localisation des mutations dans le génome du VHC. La flèche bleue (1) indique la mutation dans la région NS5B (9119-**UGCGAGGACCGG**-9108). La flèche bleue (2) pointe à la mutation dans le 3'UTR-VR (9387-**ACACUCCAGGCC**-9398). Les lettres en gras représentent les séquences ayant été mutées. B) L'ARN génomique de l'ER1b<sub>wt</sub> et muté et l'ARN génomique de JFH1 suite à leur migration sur gel de formaldéhyde-agarose. 1- ARN-ER1b avec mutation dans la région NS5B. 2- ARN-ER1b avec mutation dans la région variable du 3'UTR. 3- ER1b avec une double mutation complémentaire dans la région variable du 3'UTR et du NS5B. 4- ARN-JFH1 sans mutation. 5- ARN-ER1b<sub>wt</sub>. 6- ER1b cassette sans 3'UTR avec le site de restriction *XbaI*.

Les cellules Huh7.5 ont été transfectées par l'ER1b<sub>wt</sub>, ER1b<sub>mut</sub> et JFH1<sub>wt</sub>. Les ARN viraux totaux ont été quantifiés par RT-qPCR au 3<sup>ème</sup> jour et au 9<sup>ème</sup> jour post-transfection afin de pouvoir comparer la production virale des mutants vis-à-vis la souche sauvage.

La Figure 4.3 démontre que la mutation des séquences 3'UTR-VR du VHC 1b ou des séquences complémentaires dans la région NS5B et présentées sous forme d'une cassette VHC donnent des augmentations de 5.3X et de 3.4X des niveaux d'ARN VHC relatifs au VHC 1b parental.

Les niveaux ARN pour deux constructions mutantes du VHC ressemblent davantage aux niveaux d'ARN obtenus pour HCV 2a qui, contrairement au VHC 1b, forme un duplex VR:NS5B moins étendu (Tableau 4.1). La construction HCV 1b qui contient les mutations complémentaires dans les séquences VR and NS5B avec potentiel de former un duplex VR:NS5B similaire au VHC 1b parental démontre une augmentation des niveaux d'ARN de 2.6X. Malgré que nos trois essais expérimentaux indiquent que la mutation des séquences VHC 1b VR ou des séquences complémentaires dans la région NS5B corrèlent avec une augmentation des niveaux d'ARN, l'analyse par le t-test des moyens n'a pas démontré une signification statistique robuste lorsqu'on fait la comparaison avec les niveaux d'ARN obtenus par transfection de la cassette VHC 1b ayant un 3'UTR non muté ( $p=0.054$  pour NS;  $p=0.11$  pour VR, versus le CS-HCV1b-3'UTR).





**Figure 4.3 : Les niveaux comparatifs d'ARN viral des mutants VHC versus le VHC 1bwt au 9<sup>ème</sup> jour.** La réplication de l'ARN génomique du VHC 1b<sub>wt</sub> versus les constructions du VHC 1b qui contiennent le VHC 2a 3'UTR, la mutation dans NS5b (NS), la mutation dans le 3'UTR (VR), et la construction VHC 1b qui contient les mutations complémentaires dans NS and VR. La valeur arbitraire de 1 a été attribuée à la réplication de l'ARN VHC 1b<sub>wt</sub>. Les histogrammes représentent la moyenne +/- SE de trois transfections indépendantes.

## 5. DISCUSSION

Des exemples d'appariement entre des séquences d'ARN situées à distance ont été rapportés chez certains membres des *Flaviviridae*. Ces appariements peuvent se faire directement entre bases complémentaires, ou par l'intermédiaire de protéines (Turner, Witwer et al. 2004, Alvarez, Lodeiro et al. 2005). Le génome du VHC héberge un réseau complexe d'interactions ARN-ARN distales qui existent en équilibre dynamique. Ensemble, ces interactions modulent l'initiation des événements viraux essentiels et contrôlent le passage entre les différentes étapes du cycle viral (Shetty, Kim et al. 2010, Romero-Lopez and Berzal-Herranz 2012, Palau, Masante et al. 2013, Shetty, Stefanovic et al. 2013). Cependant, la fonction de ces interactions génomiques dans la réplication du VHC reste encore à élucider.

Suite à l'identification *in situ* par notre laboratoire d'un duplex entre des séquences du 3'UTR VR et du NS5B (Rance et al. 2013), nous avons proposé l'hypothèse que ce duplex puisse avoir un rôle sur la réplication du VHC. Cette idée dérive du fait que la région duplexe soit localisée adjacente au poly (U/UC) qui est connu pour son implication dans la réplication virale (Yi and Lemon 2003).

Nous avons abordé le projet par la création de mutations dans les régions appariées afin de brimer la formation du duplex. À cette fin notre premier défi était l'amélioration de l'efficacité de la transfection des génomes viraux du VHC dans les cellules Huh7.5. Nos résultats confirment que le milieu cytomix, qui contient l'ATP/GLU, donne la meilleure viabilité cellulaire (32.9%) et efficacité (10%) suite à la transfection. Nous avons ainsi utilisé ce milieu dans nos essais de transfection.

Dans un second temps, nous avons déterminé la fenêtre temporelle de production du VHC (ER1b et JFH1) suite à la transfection des cellules Huh7.5 afin d'identifier le jour où les particules virales atteignent un niveau maximal de production. Une étude semblable a été réalisée par une équipe japonaise qui a examiné la cinétique de production de particules virales suite à l'infection des cellules Huh7 par le virus JFH1 (Wakita and Kato 2006). Ainsi nous avons inclus la JFH1 comme référence dans notre expérience.

Nos données pour l'infection à l'ER1b démontrent que le bas de la courbe survient au 3<sup>e</sup> jour post transfection ( $9,91 \times 10^3$  copies/ml) et le haut de la courbe survient au 9<sup>e</sup> jour post-transfection ( $2,05 \times 10^5$  copies/ml). Avant le 3<sup>e</sup>me jour on décèle l'inoculum utilisé lors de la transfection, tandis qu'après 3 jours on décèle du virus produit de novo. Comparativement au virus JFH1, la croissance du virus ER1b est plus modérée, ce qui concorde avec les résultats publiés auparavant (Kato, Date et al. 2006).

Suite à ces expériences préliminaires, nous avons étudié l'influence de l'interaction ARN-ARN distale du duplex 3'UTR VR-NS5B sur la réplication du VHC de génotype 1b (ER1b). Selon des études précédentes, la région 3'UTR aurait un rôle important dans la réplication du VHC (Friebe and Bartenschlager 2002, Yi and Lemon 2003). Des travaux plus récents ont fait valoir que les structures conservées de forme 'tige-boucle' situées dans la séquence NS5B coordonnent et renforcent la réplication du VHC par des appariements de base avec le 3'UTR (Diviney, Tuplin et al. 2008). Alors, afin de déterminer si notre duplex avait lui aussi un rôle dans la réplication virale, nous avons construit du virus ER1b avec mutations spécifiques aux séquences d'appariement.

À l'aide de la technique RT-qPCR, nous avons observé une augmentation du niveau de l'ARN suite à la transfection des mutants VR et NS comparativement au niveau de l'ARN viral de l'ER1b parental (Figure 4.3). Nos données suggèrent que lorsqu'on brime le duplex par l'altération des séquences respectives localisées dans le 3'UTR VR ou le NS5B, il y a une augmentation de 5.3X et de 3.4X dans le niveau d'ARN viral produit comparé à l'ER1b parental. Le niveau d'ARN viral obtenu suite à la reconstitution des deux sites complémentaires est de 2.6X comparé à celui obtenu lors de la transfection de la cassette d'ER1b parental.

Bien que ces résultats n'atteignent pas un niveau de confiance statistiquement significatif, ils font valoir une tendance vers la hausse comparée au virus parental. Notamment, la fonction du duplex en question entre les séquences du 3'UTR-VR et du NS5B serait de moduler la synthèse de l'ARN viral. Il serait à propos de vérifier ces résultats par d'autres méthodes. Par exemple, cette vérification pourrait se faire au niveau protéique moyennant la technique de fluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique pour une protéine encodée par le VHC (comme la NS5A). Aussi, étant donné que les cellules transfectées par l'ARN de l'ER1b sont productrices de particules virales infectieuses (Rance et al. 2013), nous pourrions récolter les surnageants au 9<sup>e</sup> jour, les inoculer sur des cellules Huh7.5 naïves, et titrer le virus produit. Cependant, ces méthodes de vérification ne tiennent pas compte d'un problème inhérent dans notre système. En fait, suite à réflexion, nous sommes d'avis que la technique de transfection par électroporation n'ait pas permis la précision souhaitable pour bien quantifier les différences de production virale entre nos mutants et le virus parental. Donc, nous proposons de répéter les expériences en utilisant d'emblée l'infection virale au lieu de la transfection. L'infection permettra un meilleur contrôle sur la quantité de l'inoculum/cellule via le calcul d'unités infectieuses, ce que la transfection par électroporation ne peut pas offrir dû au taux élevé de mortalité cellulaire. Il

serait aussi envisageable d'utiliser des méthodes de transfection moins toxiques pour les cellules.

Enfin, une méthode encore plus précise pour mesurer la réplication virale, sans interférence par l'ARN génomique du VHC dans l'inoculum au moment de la transfection, serait de rechercher le brin de polarité négative qui est synthétisé *de novo* et qui sert d'intermédiaire de la réplication virale. On utiliserait la technique de RT-PCR à l'aide d'une amorce spécifique pour repêcher d'abord le brin négatif, suivi par la qPCR pour amplifier le produit de cette première amplification.

Les génotypes du VHC se différencient par leur capacité répliquative. Bien que la 3'UTR VR soit hétérogène, de la part de sa longueur et de sa composition, entre les différents génotypes (Han and Houghton 1992, Tokita, Okamoto et al. 1996), elle est hautement conservée à l'intérieur d'un même génotype (Kolykhalov, Feinstone et al. 1996, Yanagi, Purcell et al. 1997, Yanagi, St Claire et al. 1998). La création de mutations dans les séquences du 3'UTR VR qui forment un duplexe avec des séquences complémentaires du NS5B, et la construction de cassettes des 3'UTR spécifiques aux génotypes 1b et 2a, faciliteront des études perspectives permettant d'inter-changer le 3'UTR d'un génotype à un autre afin d'élucider l'impact du VR sur la réplication virale. Ainsi, le travail substantiel que j'ai fait lors de la conception et construction des cassettes est un bénéfice escompté de ce projet de maîtrise.

La structure génomique des hépacivirus partage de nombreuses ressemblances et particularités avec les pestivirus de la famille *Flaviviridae*. Selon une étude de la séquence nucléotidique du 3'UTR des pestivirus, les auteurs ont identifié une région variable et une région conservée localisées dans l'extrémité 3'UTR (Deng and Brock 1993). En fait, l'organisation du génome et

la stratégie de traduction des pestivirus sont très similaires à celles des hépacivirus. Cependant, la ressemblance structurelle du 3'UTR et l'hétérogénéité élevée de la séquence nucléotidique de la VR suggèrent que cette dernière n'ait pas une fonction critique à la réplication virale. Les investigateurs de l'étude postulent que la VR serve d'élément auxiliaire afin de maintenir la structure fonctionnelle d'autres régions génomiques. Nos résultats vont dans le même sens, suggérant que la VR pourrait servir de switch moléculaire pour moduler la réplication virale, par exemple lors de la transition de la synthèse ARN de brin (-) au brin (+) et vice-versa.

Cette étude a permis un premier regard sur la fonction d'un duplex entre le 3'UTR VR et son complément dans NS5B. Malgré que les résultats ne soient pas concluants par rapport aux statistiques, les données obtenues sont intéressantes, nous permettant de raffiner l'expérimentation afin d'augmenter la précision des mesures et arriver à une meilleure compréhension du rôle de l'interaction entre ces régions distales de l'ARN génomique viral.

## 6. CONCLUSION

La pathogénèse de l'hépatite C est intimement liée à la capacité du VHC à persister longtemps dans la plupart des personnes infectées. Les mécanismes de la persistance du VHC à long terme demeurent incomplètement caractérisés.

Divers facteurs viraux et cellulaires peuvent influencer le cycle de réplication du VHC. L'un de ces facteurs est l'arrangement structural secondaire et tertiaire du génome VHC. Nos résultats soutiennent l'idée que les structures génomiques ont un impact sur la réplication virale. En fait, nos données suggèrent qu'une fonction potentielle du duplex incorporant les séquences respectives du 3'UTR VR et leurs compléments dans le NS5B est d'agir de modulateur de la synthèse d'ARN viral.

L'hépatite C est une infection chronique et indolente, de sorte que les individus infectés ne réalisent pas d'avoir attrapé le virus jusqu'à ce que des symptômes cliniques émergent, y compris la jaunisse, l'urine foncée et la fatigue. Bien qu'il existe des médicaments antiviraux contre le VHC permettant de guérir environ 90% des sujets infectés par ce virus et réduisant ainsi le risque de décès dû à la cirrhose et au cancer hépatique, le coût exorbitant de ces médicaments ne les rend pas à la portée de tous. Une meilleure compréhension des interactions distales permettra de déterminer si l'identification de ces structures met en évidence d'autres cibles pour le développement de traitements antiviraux. Sur un plan purement fondamental, la continuation de cette étude permettra d'éclairer les détails du processus de réplication du VHC et, par extension, d'autres membres des *Flaviviridae*.

## 7. RÉFÉRENCES

- Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G. B. Knight and Q. X. Zhang (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." Proc Natl Acad Sci U S A**96**(22): 12766-12771.
- Ago, H., T. Adachi, A. Yoshida, M. Yamamoto, N. Habuka, K. Yatsunami and M. Miyano (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." Structure**7**(11): 1417-1426.
- Aizaki, H., K. S. Choi, M. Liu, Y. J. Li and M. M. Lai (2006). "Polypyrimidine-tract-binding protein is a component of the HCV RNA replication complex and necessary for RNA synthesis." J Biomed Sci**13**(4): 469-480.
- Albecka, A., S. Belouzard, A. Op de Beeck, V. Descamps, L. Goueslain, J. Bertrand-Michel, F. Terce, G. Duverlie, Y. Rouille and J. Dubuisson (2012). "Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle." Hepatology**55**(4): 998-1007.
- 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**(10): 6367-6375.
- Alter, M. J. (2007). "Epidemiology of hepatitis C virus infection." World J Gastroenterol**13**(17): 2436-2441.
- 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**(11): 6631-6643.
- Andre, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J. L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Brechot, G. Paranhos-Baccala and V. Lotteau (2002). "Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles." J Virol**76**(14): 6919-6928.



- Andre, P., G. Perlemuter, A. Budkowska, C. Brechot and V. Lotteau (2005). "Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism." Semin Liver Dis**25**(1): 93-104.
- Appel, N., M. Zayas, S. Miller, J. Krijnse-Locker, T. Schaller, P. Friebe, S. Kallis, U. Engel and R. Bartenschlager (2008). "Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly." PLoS Pathog**4**(3): e1000035.
- Barria, M. I., A. Gonzalez, J. Vera-Otarola, U. Leon, V. Vollrath, D. Marsac, O. Monasterio, T. Perez-Acle, A. Soza and M. Lopez-Lastra (2009). "Analysis of natural variants of the hepatitis C virus internal ribosome entry site reveals that primary sequence plays a key role in cap-independent translation." Nucleic Acids Res**37**(3): 957-971.
- Bartenschlager, R., F. Penin, V. Lohmann and P. Andre (2011). "Assembly of infectious hepatitis C virus particles." Trends Microbiol**19**(2): 95-103.
- Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, J. Mous and H. Jacobsen (1994). "Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing." J Virol**68**(8): 5045-5055.
- Bartenschlager, R., M. Frese and T. Pietschmann (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence." Adv Virus Res**63**: 71-180.
- Bartenschlager, R., V. Lohmann and F. Penin (2013). "The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection." Nat Rev Microbiol**11**(7): 482-496.
- Bartenschlager, R., V. Lohmann, T. Wilkinson and J. O. Koch (1995). "Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation." J Virol**69**(12): 7519-7528.
- Barth, H., C. Schafer, M. I. Adah, F. Zhang, R. J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T. H. Van Kuppevelt, E. Depla, F. Von Weizsacker, H. E. Blum and T. F. Baumert (2003). "Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate." J Biol Chem**278**(42): 41003-41012.
- Behrens, S. E., L. Tomei and R. De Francesco (1996). "Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." EMBO J**15**(1): 12-22.

- Blackard, J. T., M. T. Shata, N. J. Shire and K. E. Sherman (2008). "Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem." Hepatology**47**(1): 321-331.
- Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski and Y. Rouille (2006). "Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis." J Virol**80**(14): 6964-6972.
- Blight, K. J. (2011). "Charged residues in hepatitis C virus NS4B are critical for multiple NS4B functions in RNA replication." J Virol**85**(16): 8158-8171.
- 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**(10): 7345-7352.
- Boulang, S., C. Vanbelle, C. Ebel, F. Penin and J. P. Laverne (2005). "Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features." J Virol**79**(17): 11353-11365.
- Boulang, S., P. Targett-Adams and J. McLauchlan (2007). "Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus." J Gen Virol**88**(Pt 8): 2204-2213.
- Boulang, S., R. Montserret, R. G. Hope, M. Ratinier, P. Targett-Adams, J. P. Laverne, F. Penin and J. McLauchlan (2006). "Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets." J Biol Chem**281**(31): 22236-22247.
- Bressanelli, S., L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R. L. Vitale, M. Mathieu, R. De Francesco and F. A. Rey (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A**96**(23): 13034-13039.
- 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**(19): 5041-5045.
- Bryson, P. D., N. J. Cho, S. Einav, C. Lee, V. Tai, J. Bechtel, M. Sivaraja, C. Roberts, U. Schmitz and J. S. Glenn (2010). "A small molecule inhibits HCV replication and alters NS4B's subcellular distribution." Antiviral Res**87**(1): 1-8.

- Caillet-Saguy, C., S. P. Lim, P. Y. Shi, J. Lescar and S. Bressanelli (2014). "Polymerases of hepatitis C viruses and flaviviruses: structural and mechanistic insights and drug development." Antiviral Res**105**: 8-16.
- Cantero-Camacho, A. and J. Gallego (2015). "The conserved 3'X terminal domain of hepatitis C virus genomic RNA forms a two-stem structure that promotes viral RNA dimerization." Nucleic Acids Res**43**(17): 8529-8539.
- Carrere-Kremer, S., C. Montpellier-Pala, L. Cocquerel, C. Wychowski, F. Penin and J. Dubuisson (2002). "Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus." J Virol**76**(8): 3720-3730.
- Chamberlain, R. W., N. Adams, A. A. Saeed, P. Simmonds and R. M. Elliott (1997). "Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East." J Gen Virol**78 ( Pt 6)**: 1341-1347.
- Chang, K. S. and G. Luo (2006). "The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is required for efficient replication of hepatitis C virus (HCV) RNA." Virus Res **115**(1): 1-8.
- Chevaliez, S. and J. M. Pawlotsky (2006). HCV Genome and Life Cycle. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. S. L. Tan. Norfolk (UK).
- Cho, N. J., H. Dvory-Sobol, C. Lee, S. J. Cho, P. Bryson, M. Masek, M. Elazar, C. W. Frank and J. S. Glenn (2010). "Identification of a class of HCV inhibitors directed against the nonstructural protein NS4B." Sci Transl Med **2**(15): 15ra16.
- Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley and M. Houghton (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." Science **244**(4902): 359-362.
- Cocquerel, L., S. Duvet, J. C. Meunier, A. Pillez, R. Cacan, C. Wychowski and J. Dubuisson (1999). "The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum." J Virol **73**(4): 2641-2649.
- Connelly, M. A. and D. L. Williams (2004). "Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids." Curr Opin Lipidol **15**(3): 287-295.
- Cornberg, M., H. A. Razavi, A. Alberti, E. Bernasconi, M. Buti, C. Cooper, O. Dalgard, J. F. Dillon, R. Flisiak, X. Forns, S. Frankova, A. Goldis, I. Goulis, W. Halota, B. Hunyady, M. Lagging, A. Largen, M. Makara, S. Manolakopoulos, P. Marcellin, R. T. Marinho,

- S. Pol, T. Poynard, M. Puoti, O. Sagalova, S. Sibbel, K. Simon, C. Wallace, K. Young, C. Yurdaydin, E. Zuckerman, F. Negro and S. Zeuzem (2011). "A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel." *Liver Int* **31 Suppl 2**: 30-60.
- Dao Thi, V. L., C. Granier, M. B. Zeisel, M. Guerin, J. Mancip, O. Grano, F. Penin, D. Lavillette, R. Bartenschlager, T. F. Baumert, F. L. Cosset and M. Dreux (2012). "Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps." *J Biol Chem* **287**(37): 31242-31257.
- Davis, D. R. and P. P. Seth (2011). "Therapeutic targeting of HCV internal ribosomal entry site RNA." *Antivir Chem Chemother* **21**(3): 117-128.
- De Chasse, B., V. Navratil, L. Tafforeau, M. S. Hiet, A. Aublin-Gex, S. Agaue, G. Meiffren, F. Pradezynski, B. F. Faria, T. Chantier, M. Le Breton, J. Pellet, N. Davoust, P. E. Mangeot, A. Chaboud, F. Penin, Y. Jacob, P. O. Vidalain, M. Vidal, P. Andre, C. Raboutin-Combe and V. Lotteau (2008). "Hepatitis C virus infection protein network." *Mol Syst Biol* **4**: 230.
- Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y. S. Hahn, C. M. Rice and J. Dubuisson (1997). "Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes." *J Virol* **71**(1): 697-704.
- Deng, R. and K. V. Brock (1993). "5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses." *Nucleic Acids Res* **21**(8): 1949-1957.
- Diviney, S., A. Tuplin, M. Struthers, V. Armstrong, R. M. Elliott, P. Simmonds and D. J. Evans (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**(18): 9008-9022.
- Dubuisson, J. and F. L. Cosset (2014). "Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update." *J Hepatol* **61**(1 Suppl): S3-S13.
- Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour and K. Bienz (2002). "Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex." *J Virol* **76**(12): 5974-5984.
- Evans, M. J., T. von Hahn, D. M. Tscherne, A. J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J. A. McKeating, P. D. Bieniasz and C. M. Rice (2007). "Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry." *Nature* **446**(7137): 801-805.

- Farci, P. (2002). "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 **36**(5): 582-585.
- Farquhar, M. J., K. Hu, H. J. Harris, C. Davis, C. L. Brimacombe, S. J. Fletcher, T. F. Baumert, J. Z. Rappoport, P. Balfe and J. A. McKeating (2012). "Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis." J Virol **86**(8): 4305-4316.
- Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, R. H. Purcell, H. J. Alter and P. V. Holland (1975). "Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B." N Engl J Med **292**(15): 767-770.
- Feneant, L., S. Levy and L. Cocquerel (2014). "CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection." Viruses **6**(2): 535-572.
- Flint, M., J. M. Thomas, C. M. Maidens, C. Shotton, S. Levy, W. S. Barclay and J. A. McKeating (1999). "Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein." J Virol **73**(8): 6782-6790.
- Franck, N., J. Le Seyec, C. Guguen-Guillouzo and L. Erdtmann (2005). "Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome." J Virol **79**(5): 2700-2708.
- Frank, C., M. K. Mohamed, G. T. Strickland, D. Lavanchy, R. R. Arthur, L. S. Magder, T. El Khoby, Y. Abdel-Wahab, E. S. Aly Ohn, W. Anwar and I. Sallam (2000). "The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt." Lancet **355**(9207): 887-891.
- 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**(11): 5326-5338.
- Friebe, P. and R. Bartenschlager (2009). "Role of RNA structures in genome terminal sequences of the hepatitis C virus for replication and assembly." J Virol **83**(22): 11989-11995.
- 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**(1): 380-392.

- Friebe, P., V. Lohmann, N. Krieger and R. Bartenschlager (2001). "Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication." J Virol **75**(24): 12047-12057.
- Furuse, M. and S. Tsukita (2006). "Claudins in occluding junctions of humans and flies." Trends Cell Biol **16**(4): 181-188.
- Gale, M., Jr. and E. M. Foy (2005). "Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus." Nature **436**(7053): 939-945.
- Gastaminza, P., G. Cheng, S. Wieland, J. Zhong, W. Liao and F. V. Chisari (2008). "Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion." J Virol **82**(5): 2120-2129.
- Gottwein, J. M., T. K. Scheel, T. B. Jensen, J. B. Lademann, J. C. Prentoe, M. L. Knudsen, A. M. Hoegh and J. Bukh (2009). "Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs." Hepatology **49**(2): 364-377.
- Gouttenoire, J., F. Penin and D. Moradpour (2010). "Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory." Rev Med Virol **20**(2): 117-129.
- Gouttenoire, J., R. Montserret, A. Kennel, F. Penin and D. Moradpour (2009). "An amphipathic alpha-helix at the C terminus of hepatitis C virus nonstructural protein 4B mediates membrane association." J Virol **83**(21): 11378-11384.
- Gouttenoire, J., V. Castet, R. Montserret, N. Arora, V. Raussens, J. M. Ruyschaert, E. Diesis, H. E. Blum, F. Penin and D. Moradpour (2009). "Identification of a novel determinant for membrane association in hepatitis C virus nonstructural protein 4B." J Virol **83**(12): 6257-6268.
- Hahm, B., Y. K. Kim, J. H. Kim, T. Y. Kim and S. K. Jang (1998). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus." J Virol **72**(11): 8782-8788.
- Han, J. H. and M. Houghton (1992). "Group specific sequences and conserved secondary structures at the 3' end of HCV genome and its implication for viral replication." Nucleic Acids Res **20**(13): 3520.
- Harris, H. J., C. Clerte, M. J. Farquhar, M. Goodall, K. Hu, P. Rassam, P. Dosset, G. K. Wilson, P. Balfe, S. C. Ijzendoorn, P. E. Milhiet and J. A. McKeating (2013). "Hepatoma

- polarization limits CD81 and hepatitis C virus dynamics." Cell Microbiol **15**(3): 430-445.
- Harris, H. J., C. Davis, J. G. Mullins, K. Hu, M. Goodall, M. J. Farquhar, C. J. Mee, K. McCaffrey, S. Young, H. Drummer, P. Balfe and J. A. McKeating (2010). "Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry." J Biol Chem **285**(27): 21092-21102.
- He, L. F., D. Alling, T. Popkin, M. Shapiro, H. J. Alter and R. H. Purcell (1987). "Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration." J Infect Dis **156**(4): 636-640.
- He, Y., K. A. Staschke and S. L. Tan (2006). HCV NS5A: A Multifunctional Regulator of Cellular Pathways and Virus Replication. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. S. L. Tan. Norfolk (UK).
- Heintges, T. and J. R. Wands (1997). "Hepatitis C virus: epidemiology and transmission." Hepatology **26**(3): 521-526.
- Hellen, C. U. (2009). "IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry." Biochim Biophys Acta **1789**(9-10): 558-570.
- Henke, J. I., D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C. G. Schuttler, C. Fehr, C. Junemann and M. Niepmann (2008). "microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA." EMBO J **27**(24): 3300-3310.
- Herker, E. and M. Ott (2011). "Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids." Trends Endocrinol Metab **22**(6): 241-248.
- Herker, E., C. Harris, C. Hernandez, A. Carpentier, K. Kaehlcke, A. R. Rosenberg, R. V. Farese, Jr. and M. Ott (2010). "Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1." Nat Med **16**(11): 1295-1298.
- Hijikata, M., H. Mizushima, T. Akagi, S. Mori, N. Kakiuchi, N. Kato, T. Tanaka, K. Kimura and K. Shimotohno (1993). "Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus." J Virol **67**(8): 4665-4675.
- 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**(10): 955-968.

- 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**(2): 1165-1174.
- Hoofnagle, J. H. (1997). "Hepatitis C: the clinical spectrum of disease." Hepatology **26**(3 Suppl 1): 15S-20S.
- Houghton, M. (2009). "The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus." J Hepatol **51**(5): 939-948.
- Ide, Y., L. Zhang, M. Chen, G. Inchauspe, C. Bahl, Y. Sasaguri and R. Padmanabhan (1996). "Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A." Gene **182**(1-2): 203-211.
- 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**(11): 8698-8706.
- Ito, T. and M. M. Lai (1999). "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 **254**(2): 288-296.
- Ivanyi-Nagy, R., I. Kanevsky, C. Gabus, J. P. Lavergne, D. Ficheux, F. Penin, P. Fosse and J. L. Darlix (2006). "Analysis of hepatitis C virus RNA dimerization and core-RNA interactions." Nucleic Acids Res **34**(9): 2618-2633.
- Ji, H., C. S. Fraser, Y. Yu, J. Leary and J. A. Doudna (2004). "Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 16990-16995.
- Jiang, J., X. Wu, H. Tang and G. Luo (2013). "Apolipoprotein E mediates attachment of clinical hepatitis C virus to hepatocytes by binding to cell surface heparan sulfate proteoglycan receptors." PLoS One **8**(7): e67982.
- Jin, Z., V. Leveque, H. Ma, K. A. Johnson and K. Klumpp (2012). "Assembly, purification, and pre-steady-state kinetic analysis of active RNA-dependent RNA polymerase elongation complex." J Biol Chem **287**(13): 10674-10683.
- Jirasko, V., R. Montserret, J. Y. Lee, J. Gouttenoire, D. Moradpour, F. Penin and R. Bartenschlager (2010). "Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of



- the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly." PLoS Pathog **6**(12): e1001233.
- Jirasko, V., R. Montserret, N. Appel, A. Janvier, L. Eustachi, C. Brohm, E. Steinmann, T. Pietschmann, F. Penin and R. Bartenschlager (2008). "Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly." J Biol Chem **283**(42): 28546-28562.
- Jones, C. T., C. L. Murray, D. K. Eastman, J. Tassello and C. M. Rice (2007). "Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus." J Virol **81**(16): 8374-8383.
- Jones, D. M. and J. McLauchlan (2010). "Hepatitis C virus: assembly and release of virus particles." J Biol Chem **285**(30): 22733-22739.
- Jones, D. M., A. H. Patel, P. Targett-Adams and J. McLauchlan (2009). "The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus." J Virol **83**(5): 2163-2177.
- 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**(5740): 1577-1581.
- Kaneko, T., Y. Tanji, S. Satoh, M. Hijikata, S. Asabe, K. Kimura and K. Shimotohno (1994). "Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome." Biochem Biophys Res Commun **205**(1): 320-326.
- Kang, S. M., J. K. Choi, S. J. Kim, J. H. Kim, D. G. Ahn and J. W. Oh (2009). "Regulation of hepatitis C virus replication by the core protein through its interaction with viral RNA polymerase." Biochem Biophys Res Commun **386**(1): 55-59.
- Kato, T., A. Furusaka, M. Miyamoto, T. Date, K. Yasui, J. Hiramoto, K. Nagayama, T. Tanaka and T. Wakita (2001). "Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient." J Med Virol **64**(3): 334-339.
- 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**(5): 2334-2339.
- Kieft, J. S., K. Zhou, A. Grech, R. Jubin and J. A. Doudna (2002). "Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation." Nat Struct Biol **9**(5): 370-374.

- 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**(1): 105-112.
- Klein, K. C., S. R. Dellos and J. R. Lingappa (2005). "Identification of residues in the hepatitis C virus core protein that are critical for capsid assembly in a cell-free system." J Virol **79**(11): 6814-6826.
- Kolupaeva, V. G., T. V. Pestova and C. U. Hellen (2000). "An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus." J Virol **74**(14): 6242-6250.
- 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**(6): 3363-3371.
- Krieger, M. (2001). "Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems." J Clin Invest **108**(6): 793-797.
- Kuo, G., Q. L. Choo, H. J. Alter, G. L. Gitnick, A. G. Redeker, R. H. Purcell, T. Miyamura, J. L. Dienstag, M. J. Alter, C. E. Stevens and et al. (1989). "An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis." Science **244**(4902): 362-364.
- Kwong, A. D., J. L. Kim, G. Rao, D. Lipovsek and S. A. Raybuck (1998). "Hepatitis C virus NS3/4A protease." Antiviral Res **40**(1-2): 1-18.
- Lavillette, D., E. I. Pecheur, P. Donot, J. Fresquet, J. Molle, R. Corbau, M. Dreux, F. Penin and F. L. Cosset (2007). "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 **81**(16): 8752-8765.
- Lee, H., H. Shin, E. Wimmer and A. V. Paul (2004). "cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome." J Virol **78**(20): 10865-10877.
- Lefevre, M., D. J. Felmlee, M. Parnot, T. F. Baumert and C. Schuster (2014). "Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E." PLoS One **9**(4): e95550.

- Lesburg, C. A., M. B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A. F. Mannarino and P. C. Weber (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site." Nat Struct Biol **6**(10): 937-943.
- Li, Y., D. Yamane, T. Masaki and S. M. Lemon (2015). "The yin and yang of hepatitis C: synthesis and decay of hepatitis C virus RNA." Nat Rev Microbiol **13**(9): 544-558.
- Lin, C., J. A. Thomson and C. M. Rice (1995). "A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro." J Virol **69**(7): 4373-4380.
- Lohmann, V. (2013). "Hepatitis C virus RNA replication." Curr Top Microbiol Immunol **369**: 167-198.
- Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann and R. Bartenschlager (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." Science **285**(5424): 110-113.
- Lozano, R., M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, V. Aboyans, J. Abraham, T. Adair, R. Aggarwal, S. Y. Ahn, M. Alvarado, H. R. Anderson, L. M. Anderson, K. G. Andrews, C. Atkinson, L. M. Baddour, S. Barker-Collo, D. H. Bartels, M. L. Bell, E. J. Benjamin, D. Bennett, K. Bhalla, B. Bikbov, A. Bin Abdulhak, G. Birbeck, F. Blyth, I. Bolliger, S. Boufous, C. Bucello, M. Burch, P. Burney, J. Carapetis, H. Chen, D. Chou, S. S. Chugh, L. E. Coffeng, S. D. Colan, S. Colquhoun, K. E. Colson, J. Condon, M. D. Connor, L. T. Cooper, M. Corriere, M. Cortinovis, K. C. de Vaccaro, W. Couser, B. C. Cowie, M. H. Criqui, M. Cross, K. C. Dabhadkar, N. Dahodwala, D. De Leo, L. Degenhardt, A. Delossantos, J. Denenberg, D. C. Des Jarlais, S. D. Dharmaratne, E. R. Dorsey, T. Driscoll, H. Duber, B. Ebel, P. J. Erwin, P. Espindola, M. Ezzati, V. Feigin, A. D. Flaxman, M. H. Forouzanfar, F. G. Fowkes, R. Franklin, M. Fransen, M. K. Freeman, S. E. Gabriel, E. Gakidou, F. Gaspari, R. F. Gillum, D. Gonzalez-Medina, Y. A. Halasa, D. Haring, J. E. Harrison, R. Havmoeller, R. J. Hay, B. Hoen, P. J. Hotez, D. Hoy, K. H. Jacobsen, S. L. James, R. Jasrasaria, S. Jayaraman, N. Johns, G. Karthikeyan, N. Kassebaum, A. Keren, J. P. Khoo, L. M. Knowlton, O. Kobusingye, A. Koranteng, R. Krishnamurthi, M. Lipnick, S. E. Lipshultz, S. L. Ohno, J. Mabweijano, M. F. MacIntyre, L. Mallinger, L. March, G. B. Marks, R. Marks, A. Matsumori, R. Matzopoulos, B. M. Mayosi, J. H. McAnulty, M. M. McDermott, J. McGrath, G. A.

- Mensah, T. R. Merriman, C. Michaud, M. Miller, T. R. Miller, C. Mock, A. O. Mocumbi, A. A. Mokdad, A. Moran, K. Mulholland, M. N. Nair, L. Naldi, K. M. Narayan, K. Nasser, P. Norman, M. O'Donnell, S. B. Omer, K. Ortblad, R. Osborne, D. Ozgediz, B. Pahari, J. D. Pandian, A. P. Rivero, R. P. Padilla, F. Perez-Ruiz, N. Perico, D. Phillips, K. Pierce, C. A. Pope, 3rd, E. Porrini, F. Pourmalek, M. Raju, D. Ranganathan, J. T. Rehm, D. B. Rein, G. Remuzzi, F. P. Rivara, T. Roberts, F. R. De Leon, L. C. Rosenfeld, L. Rushton, R. L. Sacco, J. A. Salomon, U. Sampson, E. Sanman, D. C. Schwebel, M. Segui-Gomez, D. S. Shepard, D. Singh, J. Singleton, K. Sliwa, E. Smith, A. Steer, J. A. Taylor, B. Thomas, I. M. Tleyjeh, J. A. Towbin, T. Truelsen, E. A. Undurraga, N. Venketasubramanian, L. Vijayakumar, T. Vos, G. R. Wagner, M. Wang, W. Wang, K. Watt, M. A. Weinstock, R. Weintraub, J. D. Wilkinson, A. D. Woolf, S. Wulf, P. H. Yeh, P. Yip, A. Zabetian, Z. J. Zheng, A. D. Lopez, C. J. Murray, M. A. AlMazroa and Z. A. Memish (2012). "Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." Lancet **380**(9859): 2095-2128.
- Luik, P., C. Chew, J. Aittoniemi, J. Chang, P. Wentworth, Jr., R. A. Dwek, P. C. Biggin, C. Venien-Bryan and N. Zitzmann (2009). "The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 12712-12716.
- Lukavsky, P. J., G. A. Otto, A. M. Lancaster, P. Sarnow and J. D. Puglisi (2000). "Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function." Nat Struct Biol **7**(12): 1105-1110.
- Lundin, M., H. Lindstrom, C. Gronwall and M. A. Persson (2006). "Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein." J Gen Virol **87**(Pt 11): 3263-3272.
- Ma, Y., J. Yates, Y. Liang, S. M. Lemon and M. Yi (2008). "NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly." J Virol **82**(15): 7624-7639.
- Ma, Y., M. Anantpadma, J. M. Timpe, S. Shanmugam, S. M. Singh, S. M. Lemon and M. Yi (2011). "Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins." J Virol **85**(1): 86-97.

- Macdonald, A. and M. Harris (2004). "Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein." J Gen Virol **85**(Pt 9): 2485-2502.
- Madan, V. and R. Bartenschlager (2015). "Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroporin." Viruses **7**(8): 4461-4481.
- Maillard, P., T. Huby, U. Andreo, M. Moreau, J. Chapman and A. Budkowska (2006). "The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins." FASEB J **20**(6): 735-737.
- Major, M. E., H. Dahari, K. Mihalik, M. Puig, C. M. Rice, A. U. Neumann and S. M. Feinstone (2004). "Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees." Hepatology **39**(6): 1709-1720.
- Masaki, T., K. C. Arend, Y. Li, D. Yamane, D. R. McGivern, T. Kato, T. Wakita, N. J. Moorman and S. M. Lemon (2015). "miR-122 stimulates hepatitis C virus RNA synthesis by altering the balance of viral RNAs engaged in replication versus translation." Cell Host Microbe **17**(2): 217-228.
- Masaki, T., R. Suzuki, K. Murakami, H. Aizaki, K. Ishii, A. Murayama, T. Date, Y. Matsuura, T. Miyamura, T. Wakita and T. Suzuki (2008). "Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles." J Virol **82**(16): 7964-7976.
- McLauchlan, J. (2000). "Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes." J Viral Hepat **7**(1): 2-14.
- McLauchlan, J., M. K. Lemberg, G. Hope and B. Martoglio (2002). "Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets." EMBO J **21**(15): 3980-3988.
- Messina, J. P., I. Humphreys, A. Flaxman, A. Brown, G. S. Cooke, O. G. Pybus and E. Barnes (2015). "Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes." Hepatology **61**(1): 77-87.
- Miyanari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata and K. Shimotohno (2007). "The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production." Nat Cell Biol **9**(9): 1089-1097.
- Moradpour, D., F. Penin and C. M. Rice (2007). "Replication of hepatitis C virus." Nat Rev Microbiol **5**(6): 453-463.

- Moradpour, D., V. Brass, E. Bieck, P. Friebe, R. Gosert, H. E. Blum, R. Bartenschlager, F. Penin and V. Lohmann (2004). "Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication." J Virol **78**(23): 13278-13284.
- Morikawa, K., C. M. Lange, J. Gouttenoire, E. Meylan, V. Brass, F. Penin and D. Moradpour (2011). "Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus." J Viral Hepat **18**(5): 305-315.
- Niepmann, M. (2013). "Hepatitis C virus RNA translation." Curr Top Microbiol Immunol **369**: 143-166.
- Op De Beeck, A., C. Voisset, B. Bartosch, Y. Ciczora, L. Cocquerel, Z. Keck, S. Fong, F. L. Cosset and J. Dubuisson (2004). "Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins." J Virol **78**(6): 2994-3002.
- Otto, G. A. and J. D. Puglisi (2004). "The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation." Cell **119**(3): 369-380.
- Otto, G. A., P. J. Lukavsky, A. M. Lancaster, P. Sarnow and J. D. Puglisi (2002). "Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction." RNA **8**(7): 913-923.
- Palau, W., C. Masante, M. Ventura and C. Di Primo (2013). "Direct evidence for RNA-RNA interactions at the 3' end of the Hepatitis C virus genome using surface plasmon resonance." RNA **19**(7): 982-991.
- Paris, L., L. Tonutti, C. Vannini and G. Bazzoni (2008). "Structural organization of the tight junctions." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 646-659.
- Pawlotsky, J. M. (2013). "Treatment of chronic hepatitis C: current and future." Curr Top Microbiol Immunol **369**: 321-342.
- Pawlotsky, J. M., L. Tsakiris, F. Roudot-Thoraval, C. Pellet, L. Stuyver, J. Duval and D. Dhumeaux (1995). "Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C." J Infect Dis **171**(6): 1607-1610.
- Pestova, T. V., I. N. Shatsky, S. P. Fletcher, R. J. Jackson and C. U. Hellen (1998). "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 **12**(1): 67-83.

- Petracca, R., F. Falugi, G. Galli, N. Norais, D. Rosa, S. Campagnoli, V. Burgio, E. Di Stasio, B. Giardina, M. Houghton, S. Abrignani and G. Grandi (2000). "Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding." J Virol **74**(10): 4824-4830.
- Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F. L. Cosset and R. Bartenschlager (2006). "Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(19): 7408-7413.
- Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A. J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi and S. Abrignani (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." Science **282**(5390): 938-941.
- Ploss, A., M. J. Evans, V. A. Gaysinskaya, M. Panis, H. You, Y. P. de Jong and C. M. Rice (2009). "Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells." Nature **457**(7231): 882-886.
- Polyak, S. J., D. M. Paschal, S. McArdle, M. J. Gale, Jr., D. Moradpour and D. R. Gretch (1999). "Characterization of the effects of hepatitis C virus nonstructural 5A protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive virus replication." Hepatology **29**(4): 1262-1271.
- Popescu, C. I., N. Callens, D. Trinel, P. Roingeard, D. Moradpour, V. Descamps, G. Duverlie, F. Penin, L. Heliot, Y. Rouille and J. Dubuisson (2011). "NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly." PLoS Pathog **7**(2): e1001278.
- Popescu, C. I., Y. Rouille and J. Dubuisson (2011). "Hepatitis C virus assembly imaging." Viruses **3**(11): 2238-2254.
- Potel, J., P. Rassam, C. Montpellier, L. Kaestner, E. Werkmeister, B. A. Tews, C. Couturier, C. I. Popescu, T. F. Baumert, E. Rubinstein, J. Dubuisson, P. E. Milhiet and L. Cocquerel (2013). "EWI-2wint promotes CD81 clustering that abrogates Hepatitis C Virus entry." Cell Microbiol **15**(7): 1234-1252.
- Pudi, R., S. Abhiman, N. Srinivasan and S. Das (2003). "Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen." J Biol Chem **278**(14): 12231-12240.

- Rance, E. et al. (2013). "Rôle de la structure du génome viral sur la réplication du virus de l'hépatite C " Université de Montréal.  
[https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/10214/Rance\\_Elodie\\_2013\\_these.pdf?sequence=4](https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/10214/Rance_Elodie_2013_these.pdf?sequence=4)
- Rai, R. and J. Deval (2011). "New opportunities in anti-hepatitis C virus drug discovery: targeting NS4B." *Antiviral Res* **90**(2): 93-101.
- Reed, K. E., J. Xu and C. M. Rice (1997). "Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo: properties of the NS5A-associated kinase." *J Virol* **71**(10): 7187-7197.
- 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**(9): 1740-1752.
- 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**(1): 103-113.
- Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R. M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese and A. Vitelli (2002). "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus." *EMBO J* **21**(19): 5017-5025.
- Sedano, C. D. and P. Sarnow (2014). "Hepatitis C virus subverts liver-specific miR-122 to protect the viral genome from exoribonuclease Xrn2." *Cell Host Microbe* **16**(2): 257-264.
- Sharma, S. D. (2010). "Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options." *Indian J Med Res* **131**: 17-34.
- Shetty, S., S. Kim, T. Shimakami, S. M. Lemon and M. R. Mihailescu (2010). "Hepatitis C virus genomic RNA dimerization is mediated via a kissing complex intermediate." *RNA* **16**(5): 913-925.
- Shetty, S., S. Stefanovic and M. R. Mihailescu (2013). "Hepatitis C virus RNA: molecular switches mediated by long-range RNA-RNA interactions?" *Nucleic Acids Res* **41**(4): 2526-2540.
- Shi, Q., J. Jiang and G. Luo (2013). "Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes." *J Virol* **87**(12): 6866-6875.



- Shimakami, T., D. Yamane, R. K. Jangra, B. J. Kempf, C. Spaniel, D. J. Barton and S. M. Lemon (2012). "Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(3): 941-946.
- Shimakami, T., M. Hijikata, H. Luo, Y. Y. Ma, S. Kaneko, K. Shimotohno and S. Murakami (2004). "Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon." J Virol **78**(6): 2738-2748.
- Shirota, Y., H. Luo, W. Qin, S. Kaneko, T. Yamashita, K. Kobayashi and S. Murakami (2002). "Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity." J Biol Chem **277**(13): 11149-11155.
- Simister, P., M. Schmitt, M. Geitmann, O. Wicht, U. H. Danielson, R. Klein, S. Bressanelli and V. Lohmann (2009). "Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase." J Virol **83**(22): 11926-11939.
- Simmonds, P. (2001). "The origin and evolution of hepatitis viruses in humans." J Gen Virol **82**(Pt 4): 693-712.
- Simmonds, P. (2013). "The origin of hepatitis C virus." Curr Top Microbiol Immunol **369**: 1-15.
- Simmonds, P., F. McOmish, P. L. Yap, S. W. Chan, C. K. Lin, G. Dusheiko, A. A. Saeed and E. C. Holmes (1993). "Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity." J Gen Virol **74** ( Pt 4): 661-668.
- Sklan, E. H. and J. S. Glenn (2006). HCV NS4B: From Obscurity to Central Stage. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. S. L. Tan. Norfolk (UK).
- Smith, D. B., J. Bukh, C. Kuiken, A. S. Muerhoff, C. M. Rice, J. T. Stapleton and P. Simmonds (2014). "Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource." Hepatology **59**(1): 318-327.
- Smith, D. B., S. Pathirana, F. Davidson, E. Lawlor, J. Power, P. L. Yap and P. Simmonds (1997). "The origin of hepatitis C virus genotypes." J Gen Virol **78** ( Pt 2): 321-328.
- Stapleford, K. A. and B. D. Lindenbach (2011). "Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes." J Virol **85**(4): 1706-1717.

- Steinmann, E. and T. Pietschmann (2010). "Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy." Viruses **2**(9): 2078-2095.
- Suzuki, T., H. Aizaki, K. Murakami, I. Shoji and T. Wakita (2007). "Molecular biology of hepatitis C virus." J Gastroenterol **42**(6): 411-423.
- Suzuki, T., K. Ishii, H. Aizaki and T. Wakita (2007). "Hepatitis C viral life cycle." Adv Drug Deliv Rev **59**(12): 1200-1212.
- Tackett, A. J., L. Wei, C. E. Cameron and K. D. Raney (2001). "Unwinding of nucleic acids by HCV NS3 helicase is sensitive to the structure of the duplex." Nucleic Acids Res **29**(2): 565-572.
- Tai, C. L., W. K. Chi, D. S. Chen and L. H. Hwang (1996). "The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3)." J Virol **70**(12): 8477-8484.
- 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**(3): 1105-1113.
- Tan, S. L. and M. G. Katze (2001). "How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A." Virology **284**(1): 1-12.
- Tanji, Y., T. Kaneko, S. Satoh and K. Shimotohno (1995). "Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A." J Virol **69**(7): 3980-3986.
- Tellinghuisen, T. L. and C. M. Rice (2002). "Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors." Curr Opin Microbiol **5**(4): 419-427.
- Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano and C. M. Rice (2005). "Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase." Nature **435**(7040): 374-379.
- Thurner, C., C. Witwer, I. L. Hofacker and P. F. Stadler (2004). "Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes." J Gen Virol **85**(Pt 5): 1113-1124.
- Tokita, H., H. Okamoto, H. Iizuka, J. Kishimoto, F. Tsuda, L. A. Lesmana, Y. Miyakawa and M. Mayumi (1996). "Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups." J Gen Virol **77** ( Pt 2 ): 293-301.

- Tscherne, D. M., C. T. Jones, M. J. Evans, B. D. Lindenbach, J. A. McKeating and C. M. Rice (2006). "Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry." J Virol **80**(4): 1734-1741.
- Tsukiyama-Kohara, K., N. Iizuka, M. Kohara and A. Nomoto (1992). "Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA." J Virol **66**(3): 1476-1483.
- Tuplin, A., D. J. Evans and P. Simmonds (2004). "Detailed mapping of RNA secondary structures in core and NS5B-encoding region sequences of hepatitis C virus by RNase cleavage and novel bioinformatic prediction methods." J Gen Virol **85**(Pt 10): 3037-3047.
- 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**(6): 824-841.
- Tuplin, A., M. Struthers, P. Simmonds and D. J. Evans (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**(14): 6908-6921.
- van den Hoff, M. J., A. F. Moorman and W. H. Lamers (1992). "Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival." Nucleic Acids Res **20**(11): 2902.
- Villordo, S. M. and A. V. Gamarnik (2009). "Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication." Virus Res **139**(2): 230-239.
- Voisset, C. and J. Dubuisson (2004). "Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins." Biol Cell **96**(6): 413-420.
- von Hahn, T., J. C. Yoon, H. Alter, C. M. Rice, B. Rehermann, P. Balfe and J. A. McKeating (2007). "Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo." Gastroenterology **132**(2): 667-678.
- Wakita, T. and T. Kato (2006). Development of an Infectious HCV Cell Culture System. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. S. L. Tan. Norfolk (UK).
- 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**(7): 791-796.

- Walker, C. M. (1997). "Comparative features of hepatitis C virus infection in humans and chimpanzees." *Springer Semin Immunopathol* **19**(1): 85-98.
- 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**(6): 3338-3344.
- Wood, J., R. M. Frederickson, S. Fields and A. H. Patel (2001). "Hepatitis C virus 3'X region interacts with human ribosomal proteins." *J Virol* **75**(3): 1348-1358.
- World Health Organization. Hepatitis C facts sheet. 2016*  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/fr/>
- Wozniak, A. L., S. Griffin, D. Rowlands, M. Harris, M. Yi, S. M. Lemon and S. A. Weinman (2010). "Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production." *PLoS Pathog* **6**(9): e1001087.
- Yamada, N., K. Tanihara, A. Takada, T. Yorihuzi, M. Tsutsumi, H. Shimomura, T. Tsuji and T. Date (1996). "Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome." *Virology* **223**(1): 255-261.
- Yamashita, T., S. Kaneko, Y. Shiota, W. Qin, T. Nomura, K. Kobayashi and S. Murakami (1998). "RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region." *J Biol Chem* **273**(25): 15479-15486.
- Yanagi, M., M. St Claire, M. Shapiro, S. U. Emerson, R. H. Purcell and J. Bukh (1998). "Transcripts of a chimeric cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1b are infectious in vivo." *Virology* **244**(1): 161-172.
- Yanagi, M., M. St Claire, S. U. Emerson, R. H. Purcell and J. Bukh (1999). "In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2291-2295.
- Yanagi, M., R. H. Purcell, S. U. Emerson and J. Bukh (1997). "Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(16): 8738-8743.

- Yao, N., P. Reichert, S. S. Taremi, W. W. Prosser and P. C. Weber (1999). "Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase." Structure **7**(11): 1353-1363.
- Yi, M. and S. M. Lemon (2003). "3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA." J Virol **77**(6): 3557-3568.
- You, S. and C. M. Rice (2008). "3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U)." J Virol **82**(1): 184-195.
- Yu, G. Y., K. J. Lee, L. Gao and M. M. Lai (2006). "Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein." J Virol **80**(12): 6013-6023.
- Yuasa, T., G. Ishikawa, S. Manabe, S. Sekiguchi, K. Takeuchi and T. Miyamura (1991). "The particle size of hepatitis C virus estimated by filtration through microporous regenerated cellulose fibre." J Gen Virol **72 ( Pt 8)**: 2021-2024.
- Zein, N. N. (2000). "Clinical significance of hepatitis C virus genotypes." Clin Microbiol Rev **13**(2): 223-235. 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**(11): 6631-6643.